

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SIMONE BEUX

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DE LEITE BOVINO *IN*  
*NATURA* POR PARÂMETROS LATODINAMOGRÁFICOS E REOLÓGICOS**

CURITIBA

2017

SIMONE BEUX

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DE LEITE BOVINO *IN*  
*NATURA* POR PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS E REOLÓGICOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em ENGENHARIA DE ALIMENTOS, no Curso de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS, Setor de TECNOLOGIA, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Nina Waszczynskyj

Co-orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

CURITIBA  
2017

---

B569a

Beux, Simone

Avaliação das propriedades de coagulação de leite bovino in natura por parâmetros  
latodinamográficos e reológicos / Simone Beux. – Curitiba, 2017.

100 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos, 2017.

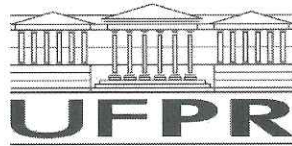
Orientadora: Nina Waszczynskyj.

Coorientador: Alessandro Nogueira.

1. Coagulação do leite. 2. Tempo de coagulação. 3. Reologia. 4. Queijos. I. Universidade  
Federal do Paraná. II. Waszczynskyj, Nina. III. Nogueira, Alessandro. IV. Título.

CDD: 637.3

---



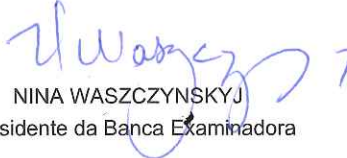
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SIMONE BEUX** intitulada: **AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DE LEITE BOVINO IN NATURA POR PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS E REOLÓGICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 13 de Dezembro de 2017.

  
NINA WASZCZYNSKYJ  
Presidente da Banca Examinadora

  
RENATA ERLUND FREITAS DE MACEDO  
Avaliador Externo

  
MARINA TOLENTINO MARINHO  
Avaliador Externo

  
ROSSANA CATIE BUENO DE GODOY  
Avaliador Externo

  
AGNES DE PAULA SCHEER  
Avaliador Interno

## AGRADECIMENTOS

-A Deus pela oportunidade de iniciar e finalizar esse trabalho: gratidão!

-A minha família pelo apoio e amor em todos os momentos, fundamental!

-A minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup>. Nina Waszczynskyj, pela orientação, ensino, contribuições, atenção, disponibilidade e amizade. Por acreditar no meu trabalho, por me mostrar caminhos e por me colocar pra cima nos momentos de insegurança. Fui agraciada com sua orientação.

-Ao professor Dr. Alessandro Nogueira pela co-orientação, apoio técnico, amizade, por confiar em mim e contribuir de maneira efetiva no meu trabalho.

-Ao professor Dr. Martino Cassandro da Università degli Studi di Padova por aceitar me supervisionar no período de doutorado PDSE, pelas importantes contribuições e por sempre estar disponível.

-À professora Dr<sup>a</sup>. Joana Léa Meira Silveira, por disponibilizar equipamento para as análises reológicas, pela atenção recebida e pelas horas dedicadas com artigo.

-A profa. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Simas pela atenção dedicada, disponibilidade em me ensinar a operar o reômetro, acompanhar, dar ideias e horas dedicadas com artigo.

-A professora Dr<sup>a</sup>. Adriana Martins por toda ajuda disponibilizada, fundamental.

-As professoras membro da banca por aceitarem contribuir com meu trabalho: muito obrigada !!!

-Ao Dr. Acácio Zielinski pela colaboração com análise estatística.

-Ao professor e amigo Vanderlei Aparecido de Lima pela colaboração com estatística.

-Ao Laboratório APCBRH de Curitiba, por contribuir na realização das análises de composição química e células somáticas.

-A Embrapa Gado de Leite, em especial ao pesquisador Dr. Marco Antônio Machado e Hyago Passe Pereira por, contribuírem de maneira efetiva com meu trabalho.

-Aos responsáveis pela ordenha de leite da Fazenda Capão da Onça da UEPG e a Priscila Judacewski que me auxiliaram na coleta de leite.

-Ao laboratório ARAV/Itália em especial a Paola, Francesca, Oriana, Marco, Nicoleta Sofia e Stefano.

-Ao amigo e colega prof. Dr. Edimir Andrade Pereira, pela amizade, parceria e auxílio aqui e na Itália.

-Aos colegas e amigos: Alessandra, Suzan, Andrea, Daiane, Fernanda, Viviane, Marcelo, Ana Paula e Shayla.

-A UTFPR, Pato Branco, em especial ao departamento de Química.

-A Fundação Araucária pelo apoio a capacitação docente.

-A CAPES pela bolsa de estudo referente ao programa PDSE.

-A família Pescarolo (Cândida, Mauro e Murilo) que me acolheram literalmente.

-A Ana Paula, Denise, Dani e Aline pela amizade e agradável convivência.

-Aos demais amigos, colegas, professores que contribuíram de alguma forma na realização desse trabalho.

## RESUMO

A produção de leite é uma atividade importante em diversos países do mundo. No Brasil, 4º maior produtor mundial (ano de 2015), o leite está entre os principais produtos da agropecuária. Com o aumento no volume de leite, a produção de derivados lácteos como os queijos vem crescendo. Porém, nem todo leite é adequado para produção de queijo, alguns são mais aptos à coagulação que outros, sendo sua composição e algumas características como as propriedades de coagulação do leite (PCL) fatores importantes para o processo tecnológico e para o rendimento econômico do laticínio. Desta forma, é interessante estudar e avaliar a capacidade de coagulação do leite a fim aperfeiçoar o destino do mesmo, bem como contribuir com estudos para melhoria genética de bovinos de leite. O presente estudo foi composto pela revisão de literatura e dois experimentos. No experimento 1 foram analisadas amostras de leite provenientes de vacas da raça Holandesa de seis rebanhos distintos da província de Veneza-Itália, em dois períodos do ano: verão (julho a setembro) e outono (setembro a dezembro). Todas as amostras foram submetidas às análises de gordura, proteína total, caseína, pH por espectroscopia no infravermelho médio; contagem de células somáticas por fluorescência ótica e propriedades de coagulação do leite, expressas em tempo para o início da coagulação enzimática (TCE, min) e consistência do coágulo após 30 minutos da adição do coalho ( $A_{30}$ , mm) por latodinamografia. Foram também determinados os índices de aptidão de coagulação do leite (IAC) e de temperatura e umidade (ITU). Do total de amostras analisadas, 41,2% não coagularam (NC) nos 30 minutos de análise. O maior percentual de amostras coaguladas foi para as coletadas durante o outono, período que os valores para o ITU foram mais baixos. Os dados obtidos nesse trabalho demonstram um elevado número de amostras NC, constando-se que provavelmente as condições climáticas influenciaram a capacidade de coagulação. No experimento 2 foram avaliadas amostras de leite de dezessete animais das raças Holandesa e mestiças Jersey-Holanda de um rebanho localizado na cidade de Ponta Grossa, Paraná-Brasil. Foram analisadas as propriedades reológicas da coagulação enzimática do leite, em três períodos do ano (maio, agosto e dezembro). O teor de gordura, proteína total, caseína, lactose, contagem de células somáticas e o ITU foram determinadas pelos mesmos procedimentos do experimento 1 e o pH com uso de pHmetro. As propriedades reológicas (tempo de coagulação enzimática e a força da coalhada) foram determinadas por reometria em regime oscilatório de baixa amplitude por meio dos módulos  $G'$  (de armazenamento),  $G''$  (de perda) e da  $\tan \delta$  (tangente de perda). A partir de amostras do sangue dos animais, foram determinados os genótipos para kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), beta-caseína ( $\beta$ -CN) e beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) pela técnica de PCR-RFLP. Foram encontradas diferenças entre a composição dos leites nos diferentes períodos de análise, bem como no perfil reológico. Com exceção das amostras de leite de um animal, ambos  $G'$  e  $G''$  aumentaram com o tempo, comportamento esperado e de acordo com a literatura, porém apresentaram característica de gel fraco. Com relação ao perfil proteico foram encontrados os genótipos AA; AB e BB para  $\kappa$ -CN; A1A2 e A2A2 para  $\beta$ -CN e AA; AB e BB para  $\beta$ -Lg, porém não foi estabelecida uma relação direta com as propriedades de coagulação e com o TCE. Os resultados obtidos nos 2 experimentos apontam a necessidade de estudos com relação à PCL a fim de garantir um leite de qualidade para a produção de queijos e que a determinação do teor de proteína total ou caseína não são suficientes para determinar essas propriedades. Também foi possível notar que o estresse térmico tem influência negativa sobre a PCL. Para indústria de queijos, longo TCE é o resultado de reduzida velocidade de formação do coágulo com fraca consistência final o que pode resultar em perdas no rendimento e na qualidade global principalmente para queijos maturados.

**Palavras-chave:** Coagulação do leite. Tempo de coagulação. Reologia. Queijos.

## ABSTRACT

Milk production is an important activity in various countries throughout the world. In Brazil, the 4<sup>th</sup> largest world producer (year 2015), milk is amongst the main agricultural products, and with the increase in the milk volume, the production of dairy products such as cheeses has also grown. However not all milk is adequate for cheese production, some being more apt for coagulation than others. Thus for cheese production the composition of the milk and some of its characteristics, such as the milk coagulation properties (MCP), are important for the technological process and for the economic yield of the dairy. It is therefore of interest to study and evaluate the coagulation capacity of the milk so as to perfect its destiny, and contribute to studies for the genetic improvement of dairy cattle. The present study consisted of two experiments. In the first experiment milk samples from Holstein cows in six distinct herds in the province of Venice-Italy in two periods of the year: summer (July to September) and autumn (September to December), were analyzed. All the samples were analyzed for their fat, total protein and casein contents and pH value by medium infrared spectroscopy; somatic cell count by optical fluorescence; and the milk coagulation properties by lactodynamography and expressed as the milk rennet coagulation time (RCT, min) and curd firmness ( $A_{30}$ , mm), 30 minutes after the addition of the rennet. The milk coagulation aptitude index (IAC) and temperature-humidity index (THI) were also determined. Of the total number of samples analyzed, 41.2% did not coagulate (NC) during the 30 minutes of analysis. The majority of the samples that did coagulate were taken in the autumn, period during which the THI values were lower. The data obtained in this study demonstrated an elevated number of NC samples, so probably the climatic conditions influenced the coagulation capacity. In experiment 2, milk samples from seventeen animals of Holstein and mixed Jersey-Holstein breeds from a herd located in the city of Ponta Grossa, Paraná, Brazil, were evaluated. The rheological properties of the milk rennet coagulation were analyzed at three periods during the year (May, August and December). The fat, total protein and casein contents and the somatic cell counts and THI were determined using the same procedures used in experiment 1 and the pH measured using a pHmeter. The rheological properties (rennet coagulation time and curd firmness) were determined by rheometry using a low amplitude oscillatory regime by way of the storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ) and the loss tangent ( $\tan \delta$ ). The genotypes for kappa-casein ( $\kappa$ -CN), beta-casein ( $\beta$ -CN) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) were determined from the animals' blood samples using the PCR-RFLP technique. Differences were found in the compositions of the milks obtained during the different periods of analysis, and also in the rheological profiles. With the exception of the milk samples from one animal, the values for both  $G'$  and  $G''$  increased with time, behavior expected and in agreement with the literature, since they present the characteristics of a weak gel. With respect to the protein profile the following genotypes were found: AA; AB and BB for  $\kappa$ -CN; A1A2 and A2A2 for  $\beta$ -CN and AA; AB and BB for  $\beta$ -Lg, although a direct relationship was not established with the coagulation properties or with RCT. The results of the 2 experiments show the need for studies in relation to the MCP so as to guarantee milk with adequate quality for cheese production, and also that the determination of the total protein or casein contents were not sufficient to determine these parameters. It was also possible to note that heat stress had a negative influence on MCP. For the cheese industry, a long RCT is the result of a reduced coagulum formation velocity with a weak final consistency, which can result in losses in yield and in overall quality, principally for matured cheeses.

**Keywords:** Milk coagulation. Coagulation time. Rheology. Cheeses.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MODELOS DA MICELA DE CASEÍNA: (A) PROPOSTO POR HORNE (1998); (B) APRESENTADO POR DALGLEISH (2010). (FCC: FOSFATO DE CÁLCIO COLOIDAL).....	21
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO <i>FORMAGRAPH</i> ..	30
FIGURA 3 -	(a) LATODINAMOGRAMA (FONTE: ADAPTADO DE DEL PRATO, 2001); (b) CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS DE CURVAS LATODINAMOGRÁFICAS.....	31
FIGURA 4 -	ESPECTROS MECÂNICOS DAS QUATRO PRINCIPAIS CATEGORIAS PARA MATÉRIAS EM GERAL: (a) SOLUÇÃO DILUÍDA; (b) SOLUÇÃO CONCENTRADA; (c) GEL FORTE; (d) GEL FRACO.....	35
FIGURA 5 -	PROPRIEDADES REOLOGIAS DA FORMAÇÃO DE GEL DE LEITE POR COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA, (a) PROPRIEDADES DE GELATINIZAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO APÓS ADIÇÃO DE COALHO EM 0,1 HZ (b) PROPRIEDADES REOLÓGICAS EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA.....	36
FIGURA 6 -	ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS DE ARMAZENAMENTO ( $G'$ ) E PERDA ( $G''$ ) DE LEITE EM FUNÇÃO DE TEMPO DO COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA.....	37
FIGURA 7 -	FORMAGRAPH ( <i>FOSS ELECTRIC A/S</i> , DINAMARCA) – MÓDULOS: DE AQUECIMENTO (a) E DE ANÁLISE (b); BLOCO DE AQUECIMENTO APÓS ANÁLISE (c); PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS REFERENTES ÀS AMOSTRAS DA FIGURA 7c (d).....	44
FIGURA 8 -	LEITES COAGULADOS NOS DOIS PERÍODOS DE ESTUDO: VERÃO E OUTONO.....	47
FIGURA 9 -	ALTERAÇÕES NOS $G'$ E $G''$ EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS PERÍODOS DE COLETA REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b); 13 (c) E 14 (d).....	74
FIGURA 10-	TEMPO DE COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA (TCE) EM FUNÇÃO DOS PERÍODOS DE ANÁLISE P1 (MAIO), P2 (AGOSTO) E P3 (DEZEMBRO).....	76
FIGURA 11 -	MODÚLOS $G'$ E $G''$ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA NOS PERÍODOS DE COLETA REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b); 13 (c) E 14 (d).....	75
FIGURA 12 -	VARIAÇÃO DA $\tan \delta$ EM FUNÇÃO DO TEMPO REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b) E 13 (c).....	78

FIGURA 13 -	ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS $G'$ E $G''$ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM 45 E 60 MINUTOS DE ANÁLISE NO PERÍODO P3, REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b) E 13 (c).....	79
FIGURA 14 -	ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS $G'$ E $G''$ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA EM 45 E 60 MINUTOS DE ANÁLISE NO PERÍODO P3, REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a), 10 (b) E 13 (c).....	80
FIGURA 15 -	ANÁLISE DE AGRUPAMENTO <i>TWO-WAY JOINING</i> DOS GENÓTIPOS DA CASEÍNA ( $\kappa$ -CN E $\beta$ -CN) E RAÇAS (H: HOLANDESA; M: MESTIÇA) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO (TCE), PROTEÍNA TOTAL (PT) E CASEÍNA (CN).....	83
FIGURA 16 -	ANÁLISE DE AGRUPAMENTO <i>TWO-WAY JOINING</i> DOS GENÓTIPOS DA $\beta$ -LACTOGLOBULINA E RAÇAS (H: HOLANDESA; M: MESTIÇA) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO (TCE), PROTEÍNA TOTAL (PT) E CASEÍNA (CN).....	84

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DE LEITE DE VACAS HOLANDESAS E JERSEY.....	19
TABELA 2 -	VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS ANÁLISADAS, DOS PARAMETROS LATODINAMOGRAFICOS E DO ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU) DAS AMOSTRAS.....	46
TABELA 3 -	CORRELAÇÃO DE PEARSON ( $r$ ) E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ( $R^2$ ) ENTRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PH, ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU) E PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS.....	49
TABELA 4 -	COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH, ECS, PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS E ITU DAS AMOSTRAS DE LEITE COLETADAS NO VERÃO E OUTONO PELO USO <i>TEST t</i> .....	49
TABELA 5 -	COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS NO MODELO LINEAR GENERALIZADO.....	52
TABELA 6 -	COMPARAÇÕES ESTABELECIDAS ENTRE PARES PARA INTERAÇÃO: PROPRIEDADES X PERÍODOS PARA CADA VARIÁVEL DEPENDENTE.....	53
TABELA 7 -	COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH E ECS DAS AMOSTRAS COAGULADAS (AC) E NÃO COAGULADAS (NC) ANALISADAS NO VERÃO E OUTONO.....	54
TABELA 8 -	COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS NO MODELO LINEAR GENERALIZADO ENTRE AS AMOSTRAS COAGULADAS E NÃO COAGULADAS.....	55
TABELA 9 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH, ESCORE DE CÉLULA SOMÁTICAS (ECS), NÚMERO DE PARTOS (NP), DIAS DE LACTAÇÃO (DL) E ÍNDICE DE TEMPERATURA DE UMIDADE (ITU) DOS LEITES NOS PERÍODOS: P1, P2 E P3.....	68
TABELA 10 -	COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS OBTIDOS PELAS EQUAÇÕES DE ESTIMAÇÃO GENERALIZADAS.....	69
TABELA 11 -	COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ANALISADAS ENTRE OS PERÍODOS (P1, P2 E P3) E AS RAÇAS.....	69

TABELA 12 -	CORRELAÇÃO DE PEARSON ( $r$ ) E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ( $R^2$ ) ENTRE TCE, PROPRIEDADES REOLÓGICAS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), pH, ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU), DIAS DE LACTAÇÃO (DL) E NÚMERO DE PARTOS (NP).....	71
TABELA 13 -	PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE LEITE ANALISADAS.....	72
TABELA 14 -	GENOTIPAGEM PARA O GENES DA $\kappa$ -CN, $\beta$ -CN E $\beta$ -Lg...	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>30</sub>	- Firmeza da coalhada no final de 30 minutos
AC	- Amostra coagulada
APCBRH	- Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
CCS	- Contagem de células somáticas
CN	- Caseína
CMP	- Caseinomacropéptido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DL	- Dias de lactação
ECS	- Escore de células somáticas
FAO	- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FCC	- Fosfato de cálcio coloidal
G'	- Módulo elástico
G''	- Módulo de perda
H	- Holandesa
Hz	- Hertz
IAC	- Índice de aptidão de coagulação do leite
IMCU	- Unidade internacional de coagulação do leite
ITU	- Índice de temperatura e umidade
JH	- Jersey x Holandês (Jersolanda)
k <sub>20</sub>	- Tempo (minutos) necessário para a coalhada atingir 20 mm de amplitude
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NC	- Não coagulado
NP	- Número de partos
Pa	- Pascal
PAV	- Propriedade A no verão
PAO	- Propriedade A no outono
PBV	- Propriedade B no verão
PBO	- Propriedade B no outono
PCL	- Propriedades de coagulação do leite
PCO	- Propriedade C no outono
PCV	- Propriedade C no verão
PDV	- Propriedade D no verão
PDO	- Propriedade D no outono
PEV	- Propriedade E no verão
PEO	- Propriedade E no outono
PFV	- Propriedade F no verão
PFO	- Propriedade F no outono
PT	- Proteína total
RNA	- Ácido ribonucleico
TCE	- Tempo de coagulação enzimática
tan $\delta$	- Tangente delta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 ESTADO DA ARTE.....</b>	<b>17</b>
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
4.1 PANORAMA: PRODUÇÃO DE LEITE E QUEIJO.....	18
4.2 LEITE: DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	19
4.3 MECANISMO E PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE (PCL)..	20
4.3.1 Caseína: micela.....	21
4.3.2 Coagulação ácida.....	22
4.3.3 Coagulação enzimática.....	22
4.3.4 Propriedades de coagulação do leite (PCL).....	23
4.3.5 Fatores que afetam as PCL.....	24
4.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE.....	29
4.4.1 Latodinamografia (LAT).....	29
4.4.2 Reologia - reometria oscilatória.....	33
<b>EXPERIMENTO 1: PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS DE ORIGEM ITALIANA E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E AMBIENTAL.....</b>	<b>38</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>38</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>39</b>
<b>5 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>40</b>
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1.1 Material.....	42
5.1.2 Métodos.....	42
5.1.2.1 Determinação da gordura, proteína total, caseína, pH e contagem de células somáticas .....	42
5.1.2.2 Análise das propriedades de coagulação do leite (PCL).....	43
5.1.2.3 Determinação do índice de aptidão de coagulação do leite (IAC).....	44
5.1.2.4 Índice de temperatura e umidade (ITU).....	44

5.1.3 Análises estatísticas.....	45
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.2.1 Composição química, pH, escore de células somáticas, propriedades de coagulação do leite, índice de aptidão de coagulação e índice de temperatura e umidade.....	46
5.2.2 Análises comparativas entre as amostras de leite coaguladas (AC) e não coaguladas (NC).....	53
5.3 CONCLUSÕES.....	57
<b>EXPERIMENTO 2: PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LEITE BOVINO <i>IN NATURA</i> COLETADOS NA CIDADE DE PONTA GROSSA – PARANÁ, BRASIL.....</b>	<b>58</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>60</b>
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
6.1.1 Material.....	61
6.1.2 Métodos.....	62
6.1.2.1 Determinação da gordura, proteína total, caseína e contagem de células somáticas.....	62
6.1.2.2 Determinação do pH.....	63
6.1.2.3 Análise do polimorfismo genético da $\kappa$ -caseína, $\beta$ -caseína e $\beta$ -lactoglobulina.....	63
6.1.2.4 Ensaios reológicos.....	65
6.1.2.5 Índice de temperatura e umidade (ITU).....	65
6.1.3 Análises estatísticas.....	66
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.2.1 Composição química, pH, escore de células somáticas e índice de temperatura e umidade.....	67
6.2.2 Ensaios reológicos e polimorfismo genético.....	71
6.3 CONCLUSÕES.....	85
<b>7 CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de leite tem apresentado crescimento constante. As projeções da FAO (*Food and Agriculture Organization*) apontam que em 2022 a produção mundial pode chegar a 895 milhões de toneladas, o que estimula a demanda mundial por derivados lácteos. Em 2015 o Brasil ocupava a quarta posição mundial ficando atrás dos Estados Unidos, Índia e da China na produção de leite (ZOCCAL, 2017). O aumento na produção de leite é positivo, porém, é importante garantir a qualidade do produto. A composição química e as características higiênico-sanitárias do leite são fundamentais, pois refletem diretamente nos atributos sensoriais e no rendimento de derivados como queijos, iogurtes entre outros.

Na fabricação de queijos, a coagulação do leite é uma etapa decisiva, na qual uma série de alterações físico-químicas, especialmente na micela de caseína, ocorrem durante a formação do gel. Para a indústria de laticínios, a quantidade e a qualidade de queijo obtido estão diretamente associadas ao rendimento e ao lucro da empresa, fatos estes que incentivam novos estudos com maior número de informações sobre a coagulação do leite, necessidade esta observada na literatura sobre o assunto nos últimos anos (CASSANDRO et al., 2008; BITTANTE; PENASA; CECCHINATO, 2012; BONFATTI, DI MARTINO, GARNIER, 2011; GUSTAVSSON et al., 2014; PENASA et al. 2016).

Pode-se constatar que as Propriedades de Coagulação do Leite (PCL) definem a capacidade do leite em reagir com um coagulante enzimático (na elaboração de queijos) e formar uma coalhada com consistência adequada e no tempo ideal para o processamento (CASSANDRO et al., 2008). Leites que apresentam características desejáveis de coagulação como: tempo de coagulação relativamente curto e firmeza da coalhada adequada para o corte resultam em maior rendimento quando comparado aos que apresentam coagulação lenta ou até mesmo não coagulam dentro de um tempo considerado ideal (FREDERIKSEN et al., 2011; PRETTO et al, 2013). Diversos fatores podem alterar os parâmetros da coagulação do leite, como a sua composição química, polimorfismo genético das proteínas, o tipo e concentração da enzima coagulante, temperatura, conteúdo de células somáticas e fatores ambientais. Ainda o estresse térmico, que está diretamente associado à elevada temperatura e umidade relativa do ambiente.

Alguns métodos físicos e ópticos têm sido utilizados para monitorar a coagulação do leite. Os sistemas ou dispositivos utilizados abrangem desde os tradicionais como teste da faca a diversos outros como a viscosidade, coagulação visual (método de Berridge), medida



da turbidez, latodinamografia, reometria oscilatória, infravermelho próximo e médio, entre outros.

Assim, este trabalho está dividido em três partes: [1] Revisão da literatura; [2] avaliação da composição química, teor de células somáticas e as propriedades de coagulação do leite (PCL) de leites de vacas Holandesas de seis diferentes propriedades (localizadas na província de Veneza-Itália), analisadas em dois períodos distintos (verão e outono), bem como suas correlações com o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) por meio da latodinamografia e; [3] estudo das propriedades reológicas da coagulação enzimática de leite bovino de animais da fazenda escola Capão da Onça (da Universidade Estadual de Ponta Grossa-UEPG/PR), realizadas em três períodos do ano, maio, agosto e dezembro, bem como a identificação do polimorfismo genético para a  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\beta$ -lactoglobulina dos animais do rebanho em estudo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades de coagulação de leite bovino *in natura* em diferentes estações do ano, de rebanhos de vacas da raça Holandesa da província de Veneza-Itália e de um rebanho composto por animais das raças Holandesas e Jersey-Holanda da cidade de Ponta Grossa, Paraná-Brasil.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar as Propriedades de Coagulação de Leite bovino (PCL) em diferentes estações do ano expressas por: parâmetros latodinamográficos e propriedades reológicas em ensaios de baixa amplitude.
- ✓ Avaliar a correlação entre parâmetros físico-químicos e fatores ambientais, estresse térmico, e as propriedades coagulação de leite bovino, *in natura*, por meio da latodinamografia em dois períodos do ano: verão e outono.
- ✓ Avaliar a correlação entre parâmetros físico-químicos, ambientais e genéticos com as propriedades coagulação de leite bovino por meio da reologia oscilatória de baixa amplitude em leite bovino *in natura* em três períodos do ano.

### 3 ESTADO DA ARTE

Nas primeiras décadas do século XX, as propriedades da coagulação do leite despertaram interesse em laticínios, entretanto, foi a partir do final dos anos setenta (1970) que essas propriedades começaram a serem estudadas em maior profundidade em função do desenvolvimento de equipamentos para definir essas características (ANNIBALDI; MORA, 1977; ZANNONI et al., 1981; MCMAHON et al., 1982). A técnica mais utilizada, na União Europeia (EU), para a análise das propriedades da coagulação do leite é a latodinamografia (BITTANTE et al., 2012). Esta técnica mede a viscosidade do leite mantido a uma temperatura fixa, após a adição de coalho e foi inicialmente utilizada como referência para análise de leite usado para fabricação de queijo *Parmigiano-Reggiano* (ANNIBALDI; MORA, 1977) e atualmente já é utilizada em mais laticínios para outros queijos maturados e de massa dura como o *Grana Padano*. Desde então vários estudos tem sido realizados com o objetivo de compreender a capacidade tecnológica do leite e fatores como condições ambientais, a estação do ano, paridade, estágio de lactação, e alimentação, bem como fatores tecnológicos como o tempo e temperatura de armazenagem de leite, o tratamento térmico, a homogeneização, a natureza e a concentração da enzima coagulante, o pH do leite e a temperatura de coagulação (OKIGBO et al., 1985; ALEANDRI; SCHNEIDER; BUTTAZZONI et al., 1989; DAL ZOTTO et al., 2008; DE MARCHI et al., 2009; PRETTO et al., 2013; PENASA et al., 2016) e, também os fatores genéticos (polimorfismo das proteínas do leite) e mastite (OKIGBO et al., 1985; MARIANI et al., 2002; IKONEN et al., 2004; VALLAS et al., 2010) tem apresentado relação com esse parâmetro. Entretanto não se tem estudos ainda com uma relação direta do índice de temperatura e umidade sobre as propriedades de coagulação do leite, ou seja, tempo de coagulação e firmeza da coalhada.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 PANORAMA: PRODUÇÃO DE LEITE E QUEIJO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) a produção mundial de leite cresceu mais de 50% nas últimas três décadas, fechando 2011 com 745,5 milhões de toneladas (OECD-FAO, 2013). De acordo com Grigol (2014), a demanda mundial de lácteos aumentou e consequentemente impulsionou a produção de leite. Nesse cenário, o Brasil ocupa a quarta posição mundial, considerando leite bovino, com volume de 35,124 mil ton, ficando atrás dos Estados Unidos, primeiro lugar, com 93,461 mil ton, seguido pela Índia com 66,462 mil ton e pela China com 37,610 mil ton para o ano de 2015 (ZOCCAL, 2017). No Brasil, nesse mesmo ano, a Região Sul ocupou a primeira posição do *ranking* sendo responsável por 35,2% da produção total, seguida pela Região Sudeste com 34,0%. Entre os estados, Minas Gerais é o maior produtor, o Paraná ocupando o segundo lugar seguido pelo Rio Grande do Sul (IBGE, 2015).

Com o aumento da produção se faz necessário diversificar a transformação do leite com o objetivo de agregar valor à matéria prima. Na União Europeia e América do Norte, por exemplo, na última década, a fração total de leite destinado à produção de queijos aumentou em 10%. Um acréscimo na produção de queijos também foi observado na Oceania e na América Latina (BITTANTE; PENASA; CECCHINATO, 2012). No Brasil a produção de queijos tem aumentado ao longo dos anos. Em 2005 a produção foi de aproximadamente 500 mil ton e em 2014 chegou a 719 mil ton, com perspectivas para quase 900 mil ton para 2024 (CONAB, 2015).

### 4.2 LEITE: DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por leite: “o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda” (BRASIL, 2011). Do ponto de vista físico-químico, o leite é um fluido complexo formado por uma solução verdadeira composta por lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas e outras moléculas menores. Nesta solução estão dispersas proteínas hidrossolúveis, as caseínas formando agregados coloidais e a gordura, que pode ser encontrada num estado emulsionado ou na forma de glóbulos (FOX;

McSWEENEY, 1998). A composição química do leite pode variar em função de fatores como: espécie, raça, idade do animal, nutrição, estações do ano, período de lactação, ordenhas (número, intervalo e processo), adulterações e doenças (como a mastite), o que também influencia sobre o volume de leite produzido (DEL PRATO, 2001). O leite bovino é composto em média por 87,3 g.100mL<sup>-1</sup> de água e 12,7 g.100mL<sup>-1</sup> de sólidos totais, assim distribuídos: 3,3-3,5 g.100mL<sup>-1</sup> de proteínas totais, 3,5-3,8 g.100mL<sup>-1</sup> gordura, 4,9 g.100mL<sup>-1</sup> lactose e de 0,7 g.100mL<sup>-1</sup> de minerais (DEL PRATO, 2001). Na TABELA 1 pode-se observar a composição média do leite das raças Holandesa e Jersey. Além dos principais constituintes citados, o leite contém diversos outros constituintes presentes em quantidades menores como vitaminas, íons metálicos e compostos aromáticos (FOX; McSWEENEY, 1998).

TABELA 1- COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DE LEITE DE VACAS HOLANDESAS E JERSEY

Raça	Gordura*	Proteína*	Lactose*	Minerais*	Extrato seco*
Holandesa	3,5	3,1	4,9	0,7	12,2
Jersey	5,5	3,9	4,9	0,7	15,0

\*g.100mL<sup>-1</sup>. Fonte: Ordóñez, 2005

A gordura é o componente do leite mais abundante e variável e que, associada às proteínas, são determinantes no rendimento de queijos. A gordura está presente na forma de glóbulos, com diâmetros médios entre 0,1 a 10 µm, podendo chegar até 22 µm, envoltos por uma membrana lipoproteica (CORRADINI, 1995; JENSEN, 2002; YE et al., 2002). Os triglicerídeos representam mais de 95% do total de lipídios na maioria das espécies. No leite de vaca, podem ser encontrados na concentração de 96-98 g.100mL<sup>-1</sup>, sendo os outros lipídios os diglicerídeos (0,3 g.100mL<sup>-1</sup>), monoglicerídeos (0,03 g.100mL<sup>-1</sup>), fosfolipídios (0,8 g.100mL<sup>-1</sup>), colesterol (0,3 g.100mL<sup>-1</sup>) e ácidos graxos livres (0,1 g.100mL<sup>-1</sup>), valores esses aproximados de acordo com Walstra et al. (1999). Os sais minerais representam menos de 1% do total e estão representados, pelo cálcio, fosforo, potássio, cloro, magnésio e sódio e em quantidades menores cobre, zinco e ferro. A composição de minerais no leite de vaca, em mg.100 g<sup>-1</sup>, é de 104,3-128,3 de cálcio; 9,7-14,6 de magnésio; 93-99,2 de fósforo; 132,3-207,9 de citratos; 39,1-64,4 de sódio; 121,2-168,1 de potássio e 77,2-120,7 de cloro (GAUCHERON, 2005; PEREDA et al., 2005). A lactose representa o principal carboidrato do leite. Ela possui um papel importante no leite e nos derivados lácteos, principalmente na produção dos lácteos fermentados; é menos solúvel que a sacarose (cerca de 10 vezes), o que

pode provocar a cristalização em alguns produtos concentrados e também pode sofrer alterações pelo calor, modificando a cor e o sabor dos produtos, entretanto, é um dos compostos com menor variação (FOX; McSWEENEY, 1998; DEL PRATO, 2001).

Com relação às substâncias nitrogenadas (nitrogênio total), 95% correspondem às proteínas do leite e 5% ao teor de nitrogênio não proteico. O leite bovino contém cerca de 3 g.100mL<sup>-1</sup> de proteína, que podem ser classificadas em dois grandes grupos: as caseínas (CN) que correspondem a 80%, dissociadas de acordo com sua solubilidade em pH 4,6 (ponto isoelétrico das caseínas) e as proteínas hidrossolúveis 20%. A caseína é uma fosfoproteína caracterizada por grupamentos ácidos e estabilizada por íons cálcio e fosfato, e é formada por quatro proteínas distintas: alfa S1 ( $\alpha_{S1}$ -CN), alfa S2 ( $\alpha_{S2}$ -CN), beta-caseína ( $\beta$ -CN) e kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) (WALSTRA; VAN VLIET, 1986; FARRELL et al., 2004, BONIZZI; BUFFONI; FELIGINI, 2009; DALGLEISH, 2011). As proteínas presentes no soro compreendem em especial  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La) e  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), na proporção aproximada de 1:3, juntamente com soroalbuminas e imunoglobulinas como constituintes menores. O nitrogênio não proteico, que corresponde a 5 g.100mL<sup>-1</sup> da composição do leite, é composto por 30 a 50% de uréia e o restante formado pela creatinina, ácido úrico, aminoácidos e amônia (ROSELER et al., 1993; BRODERICK; CLAYTON, 1997). A composição destas proteínas pode determinar o valor nutricional e as propriedades tecnológicas de leite.

Para indústria de laticínios a composição físico-química do leite é necessária para o controle de qualidade, para atender à legislação vigente, e pela relação direta com o rendimento final dos produtos. Na produção de queijos, o rendimento aumenta com a concentração de caseína, a qual afeta também propriedades tecnológicas, tais como tempo para o início da coagulação enzimática e firmeza da coalhada (WEDHOLM et al., 2006; HALLÉN et al., 2007). Outro fator a considerar é o pagamento do leite pela qualidade, que é uma forma de transmitir à cadeia produtiva as necessidades do mercado, orientando a sua produção (RIBAS, 2000).

#### 4.3 MECANISMO E PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE (PCL)

Para produção de queijos é necessário a desestabilização das proteínas (caseínas) do leite para a formação do coágulo, processo denominado de coagulação, que de forma simplificada é a transição do estado natural do leite (líquido) a gel, e ocorre via coagulação

ácida ou enzimática. Para compreender o processo de coagulação é necessário ter conhecimento de como as caseínas se encontram distribuída no leite.

#### 4.3.1 Caseína: micela

No leite, cerca de 95% das caseínas estão agregadas sob forma de dispersão coloidal (FIGURA 1), conhecidas como micelas de caseína (RUETTIMANN; LADISCH, 1987; FARRELL et al., 2006). As micelas possuem diâmetro médio entre 150 nm a 200 nm, mas com variações entre 50 a 500 nm. (HORNE, 2003; FOX; BRODKORB, 2008). A caseína é formada em proporções (4:1:4:1), por  $\alpha_{s1}$ -CN (38%),  $\alpha_{s2}$ -CN (10%),  $\beta$ -CN (35%) e  $\kappa$ -CN (15%). A  $\alpha_{s1}$ - é formada por uma cadeia de 199 resíduos de aminoácidos, a  $\alpha_{s2}$ - por 207, a  $\beta$ - por 209 e a  $\kappa$ -CN por 169, com pesos moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente (CORRADINI, 1995; DALGLEISH, 2011).

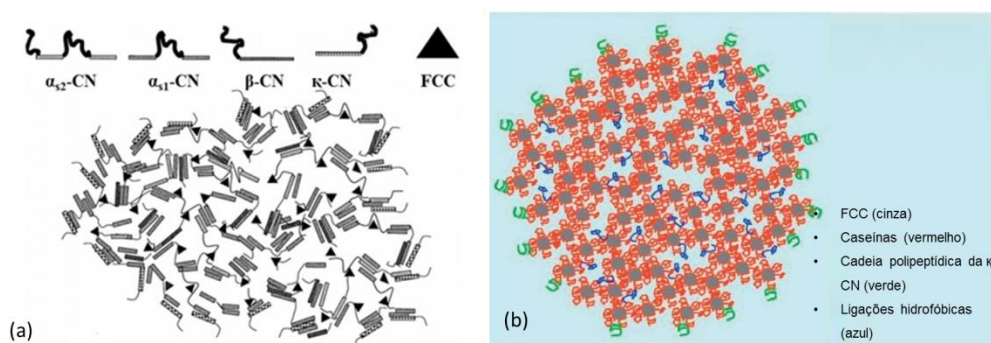


FIGURA 1- MODELOS DA MICELA DE CASEÍNA: (a) PROPOSTO POR HORNE (1998); (b) APRESENTADO POR DALGLEISH (2010). (FCC: FOSFATO DE CÁLCIO COLOIDAL).

A estrutura interna da micela de caseína é constituída por  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -CN e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal (FCC), que é constituído por cálcio, magnésio, fosfato e citrato, enquanto a  $\kappa$ -CN está localizada na superfície da micela (FOX; MCSWEENEY, 1998; DALGLEISH, 2011). Das caseínas, as do tipo  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - e a  $\beta$ -CN, são mais sensíveis à precipitação por  $\text{Ca}^{+2}$  no leite. A micela é protegida pela  $\kappa$ -CN, que apresenta poucas ligações com o cálcio, por conter poucos resíduos de fosfoserina (1-2). A  $\kappa$ -CN é uma glicoproteína localizada na superfície da micela, na qual a parte hidrofílica do C-terminal (glicopeptídeo), aparentemente atua como uma camada "cília", e proporciona uma estabilização estérica formando uma barreira contra a associação com outras micelas (WALSTRA, 1999; LUCEY, 2011).

#### 4.3.2 Coagulação ácida

Na coagulação ácida, as propriedades da micela de caseína são alteradas com a diminuição do pH, que provoca a dissociação do fosfato de cálcio coloidal e a neutralização das cargas negativas das micelas, diminuindo a solubilidade. A agregação ocorre no ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6). As ligações intermoleculares que se formam, nesse tipo de coagulação, são eletrostáticas e hidrofóbicas, formando assim um coalho mais frágil e com consistência reduzida. O leite pode ser acidificado por bactérias lácticas que transformam (via fermentação) a lactose em ácido lático ou pela adição de ácidos tais como ácido lático e ácido cítrico (LUCEY; SINGH, 1998). A coagulação das proteínas do leite por adição de ácidos é mais utilizada na produção de queijos frescos como o *Petit Suisse* e o Philadelphia (DEL PRATO, 2001).

#### 4.3.3 Coagulação enzimática

A coagulação enzimática envolve a modificação da micela de caseína através da proteólise limitada, promovida pela ação de enzimas coagulantes específicas, seguida da agregação das micelas por ligações com o cálcio (FOX; MCSWEENEY, 1998). O mecanismo deste tipo de coagulação pode ser dividido em duas fases: a primeira referente à hidrólise enzimática e a segunda à agregação das micelas de caseína (LUCEY, 2011).

Durante a primeira fase, as ligações entre os aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina) da  $\kappa$ -CN são hidrolisadas pela ação das enzimas do coalho (origem animal) ou de coagulantes (origem vegetal ou produzidos por micro-organismos) separando paracaseinato de cálcio (para- $\kappa$ -CN; peptídeos: 1-105), hidrofóbico e insolúvel e o caseinomacropeptídeo (CMP, peptídeos:106-169), hidrofílico e solúvel, que é liberado no soro, diminuindo a estabilização estérica pela perda de um grupo carregado negativamente (MOLLÉ; LÉONIL, 1995; SENGE; SCHULZ; KRENKEL, 1997).

Como resultado dessa primeira fase ocorre redução da carga líquida negativa e da repulsão estérica, assim as micelas tornam-se susceptíveis a agregação (fase secundária) formando uma rede de gel tridimensional (chamado de coalhada), que contém a parte N-terminal da  $\kappa$ -CN (para- $\kappa$ -CN, peptídeos 1-105). De acordo com Walstra, Wouters e Geurts (2006), somente quando cerca de 70% da  $\kappa$ -CN sofre hidrólise, a estabilidade coloidal das micelas é reduzida o suficiente para o início da segunda fase. O gel (coalhada) é formado por



cadeias moleculares conectadas por meio de interações hidrófobas formando uma rede tridimensional, seguida pela solidificação através de ligações cruzadas com o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$  livre), (ZOOM; VAN VLIET; WALSTRA, 1988; MELLEMA; LEERMAKERS; DE KRUIF, 1999; LUCEY, 2011).

#### 4.3.4 Propriedades de coagulação do leite (PCL)

As PCL podem ser definidas como a capacidade do leite reagir com um coagulante enzimático (na elaboração de queijos) e formar uma coalhada com consistência adequada e no tempo ideal para o processamento, bem como boa capacidade de sinérese. O coagulante reage diretamente com a caseína, que constitui a matéria-prima do queijo, da qual dependem grande parte das características reológicas da coalhada como a capacidade de contração da massa e a eficiência na transformação do leite (CASSANDRO et al., 2008). A combinação entre o tempo da adição do coalho e o início da coagulação do leite denominado de tempo de coagulação enzimática (TCE, min), do tempo necessário para a coalhada atingir 20 mm, (relacionado com a firmeza) e denominado de  $k_{20}$  (min) e da firmeza da coalhada no final de 30 minutos de análise, o chamado  $A_{30}$  (mm), são parâmetros que expressam as PCL. Esses parâmetros podem ser registrados usando sistemas baseados em técnicas ou dispositivos mecânicos e ópticos (O'CALLAGHAN; O'DONNELL; PAYNE, 2002; LUCEY, 2002). Estudos têm demonstrado que leites que apresentam características de coagulação desejável, ou seja, tempo de coagulação relativamente curto, gelificação adequada e elevada firmeza da coalhada, resultam em maior rendimento no produto final, quando comparados a leites com problemas de coagulação, refletindo em maior rentabilidade para a indústria de laticínios (FORMAGGIONI et al., 2005; PRETTO et al., 2013). Leites que começam a se agregar logo após a adição da enzima e a formar uma coalhada firme dentro de um tempo relativamente curto apresentam maior rendimento comparado a leites com PCL desfavoráveis. Isso ocorre porque o leite que coagula mais rápido retém mais caseína e gordura (ambas constituem cerca de 90% dos sólidos do queijo) no coágulo antes de ser cortado, comparado a leites com coagulação lenta (ALEANDRI; SCHNEIDER; BUTTAZZONI et al., 1989; POLITIS; NG-KWAI-HANG, 1988).

Sendo assim, o aumento da propriedade de coagulação do leite tem sido levado em consideração para elevar a eficiência do setor de lácteos. Se instituir uma seleção de leite para fabricação de queijos, com base nas PCL, pode vir a favorecer a obtenção de maiores e mais

consistentes rendimentos, o que tem contribuído de forma positiva para as queijarias (DE MARCHI et al., 2009; GEARY et al., 2010). Na União Europeia, onde o setor lácteo tem uma participação econômica representativa, baseada em produtos tradicionais como queijos, as PCL tem sido motivo de várias pesquisas nas últimas décadas (ALEANDRI; SCHNEIDER; BUTTAZZONI et al., 1989; IKONEN et al., 1999; DE MARCHI et al., 2007; CASSANDRO et al., 2008; JÕUDU, 2008; CECCHINATO et al., 2011; TIEZZI et al., 2013). Por ser um indicador da eficiência do processo de fabricação de queijo (no rendimento), principalmente para queijos duros, alguns laticínios já adotaram esse parâmetro no pagamento do leite. Na província de Trento (Itália) nos consórcios de produção do queijo Trentingrana leites com adequada PCL são premiados, os produtores recebem um valor a mais pelo produto (SUMMER et al., 2002; MALACARNE et al., 2005; PRETTO et al., 2013; PENASA et al., 2016).

#### 4.3.5 Fatores que afetam as PCL

Diversos fatores podem afetar as PCL tais como os ambientais, como a estação do ano, paridade, estágio de lactação, e alimentação, bem como fatores tecnológicos como o tempo e temperatura de armazenagem de leite, o tratamento térmico, a homogeneização, a natureza e a concentração da enzima coagulante, o pH do leite e a temperatura de coagulação (OKIGBO et al., 1985; ALEANDRI; SCHNEIDER; BUTTAZZONI et al., 1989). Também os fatores genéticos (polimorfismo das proteínas do leite) e mastite (elevado conteúdo de células somáticas) (OKIGBO et al., 1985; MARIANI et al., 2002; IKONEN et al., 2004; VALLAS et al., 2010). Dentre os fatores citados o que parece ter maior influência sobre as PCL está relacionado com a caseína (CN) e as variantes genéticas de composição, principalmente com relação à  $\beta$ -CN e a  $\kappa$ -CN (MARIANI et al., 2002).

O leite bovino contém em média 3% de proteína, sendo que as caseínas representam cerca de 80% e as proteínas hidrossolúveis 20%. Durante as últimas décadas, o melhoramento genético para gado leiteiro esteve focado em kg de proteína de leite, porém de forma isolada o conteúdo de proteína total não é o melhor indicador para as PCL, mas de fato a concentração de proteína total e caseína são importantes para resposta positiva com relação à coagulação. Propriedades tecnológicas, tais como tempo de coagulação e a firmeza da coalhada dependem muito da composição da caseína e de sua distribuição (HALLÉN et al., 2007). A composição de proteína é determinada por fatores genéticos, mas também varia com a estação do ano,

período de lactação, número de partos, nutrição e da saúde do animal (BOBE et al., 1998, IKONEN et al., 2004).

A identificação de genes polimórficos que codificam as principais proteínas do leite pode auxiliar uma melhor compreensão do processo de coagulação do leite, em particular as variantes genéticas da  $\kappa$ -CN e suas frações e da  $\beta$ -Lg, que influenciam a composição e/ou o comportamento tecnológico do leite (PATERSON; MAGGIBON; HILL, 1999). Para a CN,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, mais de 60 variantes genéticas já foram identificadas (FARRELL et al., 2004). As variantes genéticas das caseínas e das proteínas do soro influenciam muitas propriedades do leite que são cruciais no processo de coagulação (BONFATTI et al., 2008). A influência positiva dos alelos B de ambas  $\kappa$ -CN e  $\beta$ -CN já foi bem estabelecida em contraste com os alelos A e E, que são alelos associados a leites que apresentam fraca propriedade de coagulação e também para leites que não coagulam (IKONEN et al., 1999; HALLÉN et al., 2007; HALLÉN et al., 2008). Entretanto animais em período de lactação (meio e final), bem como animais com mastite também estão associados a leites com coagulação mais lenta, pois diminui o teor de CN (OKIGBO et al., 1985; IKONEN et al., 2004). De acordo com Mariani et al. (2002), leites que possuem maior teor de  $\kappa$ -CN B apresentam melhor reatividade com o coalho, resultando em maior rendimento, e ainda de acordo com Mariani e Pecorari (1991) e Lodes et al. (1996) apresentam uma coalhada mais compacta e elástica, com relação a leites com prevalência ao tipo  $\kappa$ -CN A. Kübarsepp et al. (2005), relataram que todas as medidas relacionada as PCL de leite bovino foram significativamente melhores para o genotípico B da  $\kappa$ -CN e piores para a  $\kappa$ -CN A e ainda a  $\kappa$ -CN B exibiu também a menor percentagem de amostras de leites não coagulados (NC). Auld et al. (2002) constataram que leites provenientes das raças Montbéliarde e Normanna apresentaram um tempo de coagulação mais curto e com uma coalhada mais firme quando comparados a raça Holandesa. Esta característica tem sido associada a uma maior frequência do alelo B da  $\kappa$ -CN e de um aumento da concentração de proteína e caseína. O alelo B da  $\kappa$ -CN está associado com aumento da concentração de  $\kappa$ -CN em leites comparados ao alelo A (VAN EENENNAAM; MEDRANO, 1991; BOBE et al., 1999; GRAML; PIRCHNER, 2003) e também com maior proporção de proteína total e CN. Essa característica pode estar relacionada à variante  $\kappa$ -CN B que, de acordo com Mariani e Pecorari (1991) e Di Stasio e Mariani (2000) pode estar associado a um teor mais elevado, em termos absolutos e relativos, de CN, o que implica na presença de micelas com um diâmetro médio inferior. Micelas menores apresentam maior reatividade com a enzima com maior taxa de formação da coalhada, refletindo favoravelmente

sobre as características reológicas. Glantz et al. (2010) pesquisaram a importância do tamanho da caseína micelar em leite bovino na gelificação e confirmaram que micelas menores respondem melhor com a formação de gel mais forte. O mesmo foi observado por Frederiksen et al. (2011) em leites que não coagularam ou que apresentaram fraca coagulação, os quais foram caracterizados por um baixo teor total de  $\kappa$ -CN em relação ao total de CN e por micelas de caseína maiores. A relação entre o teor de  $\kappa$ -CN e o tamanho das micelas pode estar relacionada com a fração superficial glicosilada da  $\kappa$ -CN (responsável pela repulsão estérica e eletrostática entre as micelas) o que contribui para a variação do tamanho das micelas de CN. De acordo com Bijl et al. (2014) leites com a variante B da  $\kappa$ -CN apresentam maior quantidade de  $\kappa$ -CN glicosilada comparados a leites com a variante A o que caracteriza esse leite com micelas menores.

Outra relação em termos genéticos, diz respeito ao aumento do conteúdo total de  $\kappa$ -CN ou da proporção relativa entre a  $\kappa$ -CN e os níveis totais de caseína, que diminui a quantidade de  $\alpha_{S1}$ - e  $\alpha_{S2}$ -CN e do pH, o que exerce efeitos positivo sobre as PCL (WEDHOLM et al., 2006; JÕUDU et al., 2008; BONFATTI; DI MARTINO; CARNIER, 2011).

As proteínas do soro também podem influenciar de forma indireta os resultados das PCL. Alguns estudos relataram a associação entre a composição do leite, principalmente a proteína e gordura, e as diferentes variantes genéticas para  $\beta$ -Lg (LODES et al., 1997; CELIK, 2003; BOBE et al., 2004; MOLINA et al., 2006). Hill (1993) estudou a relação entre genótipos da  $\beta$ -Lg na composição do leite na Nova Zelândia e de acordo com os resultados, o leite de vacas do genótipo AA para  $\beta$ -Lg apresentaram 28% a mais de proteína do soro, 7% a menos de caseína, 11% a mais de gordura e 6% a menos de sólidos totais que o leite das vacas do genótipo BB. Summer et al. (2002) relataram que a influência do tipo genético da  $\beta$ -Lg em leite de vacas Modaneses e observaram que vacas com  $\beta$ -Lg tipo A apresentaram um leite com maior teor de proteínas do soro, enquanto vacas com  $\beta$ -Lg tipo B produziram um leite em média, mais ricos em caseína, com efeitos significativos sobre a produtividade, particularmente para queijo. Lodes et al. (1997) observaram que o genótipo B estava associado com maiores teores de caseína e de gordura. Bobe et al. (1999; 2004) observaram maior rendimento na produção de queijos em leite de vacas do genótipo B, e associaram esse resultado às concentrações de gordura. Jensen et al. (2012) observaram em leites com boa PCL a prevalência da variante B para a  $\beta$ -Lg bem como para as proteínas  $\beta$ -CN e  $\kappa$ -CN. De acordo com Bittante, Penasa e Cecchinato (2012) a PCL pode ser influenciada pelas variações dos genes das proteínas de forma mais evidenciada para as variantes genéticas da  $\kappa$ -CN.

Outro fator relevante nas PCL é a enzima coagulante, pois a elaboração de queijo tem início com a coagulação, fase fundamental do processamento. Na coagulação enzimática do leite ocorrem modificações específicas nas micelas de caseína, através da proteólise, provocada por enzimas selecionadas, seguido pela agregação das mesmas na presença de cálcio. As enzimas podem ser de origem animal, como a quimosina, extraído do quarto estômago de bovinos adultos ou de bezerros em lactação, denominado de coalho (YOUSIF; McMAHON; SHAMMET, 1996), ou ainda por enzimas coagulantes de origem vegetal ou as obtidas por fermentação microbiana. O “coalho genético” é constituído de quimosina pura, obtida por meio da tecnologia do DNA recombinante, que permitiu a clonagem do gene que codifica a quimosina de bezerro em células de alguns micro-organismos tais como *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae* e *Kluyveromyces lactis* (NEELAKANTAN; MOHANTY; KAUSSEHIK, 1999). Dependendo da origem, o coalho e as enzimas coagulantes apresentam composições enzimáticas diferenciadas, tanto em quantidade (proporção das enzimas), quanto em qualidade (tipo de enzima) o que tem influência direta sobre a PCL. Os coalhos comerciais são compostos por quimosina (85-95%) e pepsina (5-15%), ambas extraídas de estômago de bezerros. Porém existem coalhos com essa concentração invertida, entre quimosina e pepsina, isso acontece quando são extraídos de animais adultos (FOX; MCSWEENEY, 1998). A atividade do coalho é expressa em Unidade Internacional de Coagulação do Leite (IMCU) por mililitro de leite. Algumas pesquisas relatam a influência do coalho sobre a PCL sendo o valor de  $r$  (min) relacionado linearmente com o inverso da atividade coagulante (BROWN, COLLINGE, 1986; KARLSSON, IPSEN, ARDÖ, 2007a). Pesquisas utilizando coalhos de diferentes atividades têm sido citadas na literatura na determinação da PCL. Na Itália coalhos com atividade na faixa de 0,050 a 0,060 IMCU mL<sup>-1</sup> de leite (CASSANDRO et al., 2008; CECCHINATO et al., 2009). Num intervalo de 0,110 a 0,150 IMCU mL<sup>-1</sup> de leite foram pesquisados na Estônia e Finlândia utilizando enzimas coagulantes (KÜBARSEPP et al., 2005; VALLAS et al., 2010). E na faixa de 0,330 a 0,580 IMCU mL<sup>-1</sup> em estudos realizados na Suécia (HALLÉN et al., 2007; HALLÉN et al., 2010). De acordo com Pretto et al. (2011) cada país utiliza coalho com atividade diferente para a determinação da PCL, de acordo com o tipo de queijo e o processo de fabricação utilizado nas indústrias de cada país. A temperatura do leite influencia a atividade do coalho e ela varia de acordo com o tipo de queijo a ser produzido. A faixa de temperatura ótima de coagulação para a firmeza do gel é de 30-35 °C podendo variar em função do coagulante utilizado (LUCEY, 2011).

O valor do pH do leite influencia a taxa de agregação das micelas de para-caseína, a atividade do coalho e a taxa de sinérese (FORMAGGIONI et al., 2001; SUMMER et al., 2002). Leites ligeiramente ácidos (pH entre 6,5 a 6,6) respondem melhor ao processo de coagulação em função de alguns fatores como redução na repulsão eletrostática entre micelas, floculação com um menor grau de hidrólise da  $\kappa$ -CN e o aumento da atividade do coalho (WALSTRA, 1993). De acordo com a literatura a atividade das proteinases é favorecida em pH próximo a 6,0, entretanto o pH ideal está também associado com o tipo de coalho utilizado e com o queijo que será elaborado (DEL PRATO, 2001; DE PAULA, CARVALHO, FURTADO, 2009).

O cálcio é um mineral importante no leite, tanto no aspecto nutricional quanto no tecnológico. Os íons de cálcio estão envolvidos na estabilidade interna das micelas de caseína, participando das ligações entre as moléculas de proteína, quer como fosfato de cálcio coloidal (CCP) ou diretamente ligado às caseínas (HOLT, 1992; HORNE, 1998; LEWIS, 2011). O teor de cálcio presente no leite de vaca gira em torno de 30 mM, sendo que cerca de 20 mM estão associados com as micelas de caseína e 10 mM podem estar na forma de cálcio solúvel, na sua maior parte como fosfato de cálcio ou de citrato não dissociado. No pH normal do leite cerca de 10% do total de cálcio se encontra na forma iônica,  $\text{Ca}^{2+}$  (GAUCHERON, 2005; LEWIS, 2011). O cálcio participa da fase secundária da coagulação formando as ligações cruzadas entre as caseínas já hidrolisadas pela enzima coagulante (FOX; MCSWEENEY, 1998; LUCEY, 2011),

O outro fator a ser considerado, é a mastite, que está relacionada com saúde do animal. A mastite pode ser caracterizada por mudanças físicas, químicas e bacteriológicas no leite e alterações patológicas no tecido glandular do úbere (SHARMA, 2007). Durante essa infecção pode ser observado um aumento do número de células somáticas no leite. Leites provenientes de glândulas mamárias saudáveis normalmente apresentam uma contagem de células somáticas (CCS) inferior a  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , enquanto que a infecção bacteriana pode elevar esse número a um valor superior a  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (BYTYQI et al., 2010). O monitoramento da CCS no leite apresenta duas funções: verificar o estado de saúde do úbere e indicar a qualidade tecnológica do leite (FOX; MCSWEENEY, 1998; SRINIVASAN; LUCEY, 2002). O aumento das células somáticas pode ocasionar uma redução no teor de caseína e uma elevação do pH contribuindo para um maior tempo de coagulação e resultando em uma coalhada mais frágil (IKONEN et al., 2004; CASANDRO et al., 2008). Uma possível explicação é que a plasmina, enzima que aumenta significativamente em leites com elevada

CCS, degrada rapidamente as caseínas  $\alpha_{s1}$ -CN e  $\beta$ -CN, impedindo as interações proteicas e enfraquecendo a matriz (DE MARCHI et al. 2007; SRINIVASAN; LUCEY, 2002). Os pesquisadores Vianna et al. (2008), Mazal et al. (2007) e Mاتيoli et al. (2000) relataram que o aumento da CCS está associado com menor rendimento, modificação da composição e com qualidade sensorial inferior na produção de queijos. Ikonen et al. (2004) encontraram correlações entre o tempo de coagulação e a firmeza da coalhada com as células somáticas. O aumento da CCS resultou em um aumento do tempo de coagulação (TCE, min) e na diminuição do  $A_{30}$  (mm). Comin et al. (2005) constataram que o aumento das células somáticas resultou em maior tempo para o início da coagulação. Ainda de acordo com Fonseca e Santos (2000), leite com alta CCS apresenta redução de lactose e cálcio e há aumento da concentração de sódio e cloro que são responsáveis pelo gosto salgado presente em leite de animais com mastite, e assim também comprometem também a qualidade sensorial dos derivados lácteos.

#### 4.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE

Alguns métodos físicos e ópticos têm sido utilizados para monitorar a coagulação do leite. A popularidade dos estudos sobre a coagulação do leite é devido à grande importância econômica deste processo. Os métodos ou dispositivos utilizados abrangem desde os tradicionais como teste da faca a diversos outros como: viscosidade, coagulação visual (método de Berridge), medida da turbidez, latodinamografia, reometria oscilatória de baixa amplitude de cisalhamento, infravermelho próximo e médio, entre outros (LUCEY, 2002). Os métodos latodinamografia e reometria oscilatória foram utilizados neste trabalho.

##### 4.4.1 Latodinamografia (LAT)

A latodinamografia tem sido ao longo dos anos a técnica mais utilizada para a análise da PCL (ANNIBALDI; FERRI; MORA, 1977; ZANNONI; ANNIBALDI, 1981; MCMAHON; BROWN, 1982; OKIGBO et al., 1985; IKONEN et al., 1999; IKONEN et al., 2004; CASSANDRO et al., 2008; JÕUDU et al., 2009; BONFATTI et al., 2010; TOFFANIN et al., 2012). Os equipamentos disponíveis para esta análise são: (1) Lattodinamografo® (LAT; Foss-Itália, Padova, Itália), que substituiu o Formagraph® (Foss Eléctrica, Hillerød, Dinamarca), utilizado por Annibaldi, Ferri, Mora (1977); Zannoni e Annibaldi, 1981; Ikonen

et al. (1999) e Jõudu et al. (2008; 2009) e o (2) Computerized Renneting Meter (CRM®), da Polo Trade, Itália.

O método de determinação da PCL pela latodinamografia tem sido classificado como um sistema mecânico ou reológico (O'CALLAGHAN; O'DONNELL; PAYNE, 2002) e baseia-se na gravação da oscilação, que é acionada por um campo eletromagnético criado pelo movimento de um pequeno pêndulo de aço inoxidável, imerso na amostra de leite (FIGURA 2). O equipamento tem capacidade de analisar dez amostras simultaneamente.

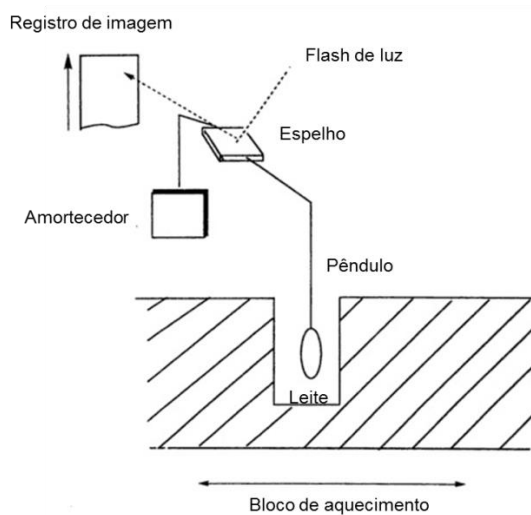


FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FORMAGRAPH.  
FONTE: FOX E MCSWEENEY (1998).

O sistema registra mudanças físico-químicas que ocorrem no leite durante o processo de coagulação, quando a enzima (coalho ou coagulante) hidrolisa a  $\kappa$ -caseína e induz a mudança da viscosidade e elasticidade do leite. Durante a análise, a temperatura do leite é mantida constante (35 °C ou na temperatura de interesse da pesquisa) e o equipamento mede então as pequenas forças que atuam sobre o pêndulo durante a coagulação (formação de gel), quando oscilam de maneira linear, quanto maior for a intensidade da coagulação, menores serão as oscilações do pêndulo. O sinal detectado é amplificado e registrado gerando diagramas em forma de “sinos” ou “taças de Champagne” denominados de latodinamograma expressos em firmeza versus tempo (AULDIST et al., 2001; O'CALLAGHAN; O'DONNELL; PAYNE, 2002). O equipamento Formagraph® conta com dispositivos que gravam a largura (mm) do gráfico durante o teste a cada 15 segundos, porém o equipamento, Lattodinamografo V2®, é mais eficiente gravando um sinal a cada 7,5 segundos (CIPOLAT-GOTET et al., 2012).



Três parâmetros (FIGURA 3a) são considerados (ANNIBALDI; FERRI; MORA, 1977):

- ✓ **r**: representa o Tempo para o início da Coagulação Enzimática (TCE), em minutos (min.), referente ao intervalo de tempo entre a adição do coalho (enzima) e o início da coagulação (ponto em que o instrumento detecta uma variação da viscosidade do meio relacionada ao início da formação da coalhada);
- ✓ **k<sub>20</sub>**: tempo necessário em minutos para o gel atingir uma consistência com amplitude de 20 mm. Trata-se de um índice inversamente proporcional à velocidade de agregação das micelas de caseína na fase secundária da coagulação enzimática.
- ✓ **A<sub>30</sub>**: firmeza ou consistência do coágulo que se determina em milímetros (mm) e corresponde a largura do diagrama obtido após 30 minutos da adição do coagulante. O A<sub>30</sub> é o tempo padrão, porém é possível realizar a análise em 45 (A<sub>45</sub>) ou 60 (A<sub>60</sub>) minutos.

De acordo com Zannoni e Annibaldi (1981) um leite é considerado excelente com relação às PCL quando apresenta valor de TCE de 11 a 18 min; k<sub>20</sub> entre 5 a 8 min e A<sub>30</sub> entre de 20 a 40 mm. Como a composição química do leite é variável, diferentes formas de curvas (FIGURA 3b), foram reconhecidas e são utilizadas como referência.

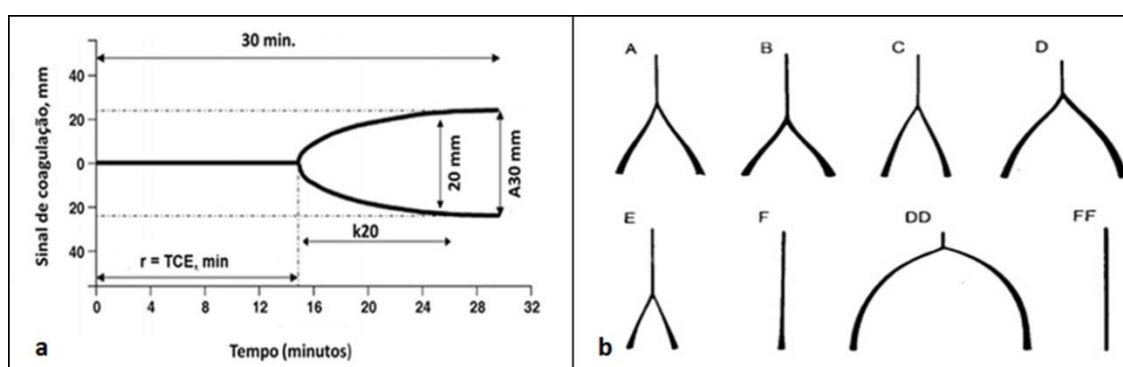


FIGURA 3 - (a) LATODINAMOGRAMA (FONTE: ADAPTADO DE DEL PRATO, 2001); (b) CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS DE CURVAS LATODINAMOGRÁFICAS. FONTE: ANNIBALDI; FERRI; MORA, 1977.

Cada diagrama representado na FIGURA 3b corresponde a leites com propriedades definidas como:

**-Tipo A:** leite com excelente característica de coagulação é considerado o mais adequado;

-**Tipo B:** leite com coagulação mais lenta em relação ao Tipo A entretanto, com consistência final relativamente elevada. Este tipo de leite é típico de bovinos em final de período de lactação e rico em caseína;

-**Tipo C:** após uma primeira fase com tempo de coagulação rápida é seguida de uma diminuição na velocidade de formação do coágulo, com uma discreta consistência final da coalhada. Este tipo de coalho ocorre em leites de bovinos em início de lactação e geralmente apresentam baixo teor de caseína;

-**Tipo D:** a fase de coagulação se desenvolve muito rápida e o coágulo alcança uma elevada consistência. Representa um tipo de leite ligeiramente ácido e/ou muito rico em caseína;

-**Tipo E:** apresenta tempo de coagulação longo, com baixa consistência final da coalhada. Em geral provém de animais com mastite (com elevado teor células somáticas). Outras possíveis causas são a predisposição genética, estresse ambiental, alimentação inadequada e/ou outras patologias.

-**Tipo F:** apresenta um tempo extremamente longo para o início coagulação e baixíssima consistência final da coalhada. Leites com elevada contagem de células somáticas com elevado valor de pH (são considerados inadequados à produção de queijo);

-**Tipo DD:** apresenta característica análoga ao leite “Tipo D”, porém mais acentuada. Encontra-se frequentemente em leite ácido ou muito velho e,

-**Tipo FF:** leite que não apresenta coagulação (no tempo de 30 min.) e são denominados como não coagulante (NC).

Os defeitos de coagulação tardia ou não coagulação e a formação lenta do gel são mais graves e frequentes do que os defeitos opostos, como uma coagulação muito rápida e consistência final excessiva. Todas as medições são realizadas automaticamente, e os dados são armazenados em um computador acoplado ao equipamento, que os registram para que sejam obtidos os resultados das PCL e a curva latodinamográfica característica de cada amostra analisada (BITTANTE; PENASA; CECCHINATO, 2012).

A latodinamografia é considerada um método de referência na determinação do tempo necessário para que a coagulação aconteça (TCE) e na determinação da firmeza da coalhada ( $A_{30}$ ), porém, a medida direta das PCL por esse método é onerosa, pois há um número limitado de amostras processadas por hora, razão pela qual não é recomendado como um método a ser aplicado para monitoração de um rebanho bovino, ou de um número elevado de amostras. O método tradicional também apresenta algumas limitações como, a existência de amostras não coagulantes (NC) em 30 minutos de análise e problemas na aquisição de valores

$k_{20}$  (IKONEN et al., 2004; TYRISEVÄ et al., 2004). O aumento da frequência de amostras de leite com elevado TCE torna o traço  $k_{20}$  decrescente de utilidade. Além disso, os valores  $k_{20}$  são caracterizados por menor repetibilidade e reprodutibilidade em relação ao TCE e muitas vezes têm sido excluídas em pesquisa, apesar da sua importância prática (é considerado um indicador do momento ideal para o corte da coalhada) (BITTANTE, 2011). O valor  $A_{30}$  (mm) é dependente do TCE (min), quanto maior o tempo de coagulação, mais curto será o intervalo disponível para endurecimento da coalhada, resultando em uma firmeza final inferior (IKONEN et al., 1999; IKONEN et al., 2004; CASSANDRO et al., 2008; CECCHINATO et al., 2011). De acordo com Bittante (2011) para superar essas limitações, novas tecnologias e a utilização de mais informações proporcionadas pela análise tradicional devem ser exploradas.

Penasa et al. (2015) agruparam os valores de TCE e  $A_{30}$  para formar o índice de aptidão de coagulação do leite (IAC), equação 1:

$$IAC = 100 + (a_{30} - média_{a_{30}})/DP_{a_{30}}*2.5 - (TCE - média_{TCE})/DP_{TCE}*2.5 \quad (1)$$

De acordo com autores além do resultado tradicional das PCL, o IAC foi criado e introduzido como um novo parâmetro, composto pelo TCE (tempo de coagulação) e  $A_{30}$  (consistência do coágulo) com um peso de 50% cada e com uma média de 100 e um desvio padrão de 5, sendo que valores maiores que 100 são desejáveis, uma vez que indicam valores favoráveis globais das PCL. O IAC tem potencial para ser adotado pela indústria de laticínios como uma medida global das PCL com intuito de premiar ou penalizar os produtores em sistemas de pagamentos do leite por qualidade (PENASA et al., 2015; 2016).

#### 4.4.2 Reologia - reometria oscilatória

A reologia é a ciência que descreve a deformação de um “corpo” sob a influência de tensões, e neste contexto, os “corpos” podem ser sólidos, líquidos ou gases. Os sólidos ideais deformam-se elasticamente e a energia necessária para a deformação é totalmente recuperada quando as tensões são removidas. Já os fluidos ideais, tais como líquidos e gases sofrem deformação irreversível (eles fluem/escoam). A energia necessária para a deformação é dissipada dentro do fluido, sob a forma de calor, e não pode ser recuperada simplesmente por remoção das tensões (SCHRAMM, 2000).

Os géis de leite são viscoelásticos, assim as propriedades reológicas do leite podem ser caracterizadas utilizando ambos os componentes viscosos e elásticos. Testes de reologia dinâmica, que envolvem a aplicação de uma deformação ou tensão oscilatória, podem fornecer informações úteis sobre géis como o processo de formação. Nos testes oscilatórios, os materiais são submetidos à variação harmônica de deformação de baixa amplitude, com deformação ou tensão em instrumentos de taxa ou tensão controlados (STEFFE, 1996).

Alguns dos principais parâmetros que são determinados a partir destes testes incluem o módulo elástico ou de armazenamento ( $G'$ ), que é uma medida da energia armazenada por ciclo de oscilação (reflete o comportamento elástico da amostra). O módulo de perda ( $G''$ ), que é uma medida da energia dissipada na forma de calor por ciclo (reflete o quanto a amostra se comporta como um líquido viscoso). E a tangente delta ( $\tan \delta$ ), que é a razão entre o módulo de perda e armazenamento ( $G''/G'$ ), da resposta à tensão ou deformação aplicada e, quando o valor de  $G'$  é maior que  $G''$  com  $\tan \delta < 1$ , considera-se que o material tem comportamento de um gel (SCHRAMM, 2000; LUCEY, 2002; HORNE; BANKS, 2004; LAXTON; BERG, 2005). Estes parâmetros são definidos de acordo com as equações 2, 3 e 4, respectivamente:

$$G' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0}\right) \cos \delta \quad (2)$$

$$G'' = \left(\frac{\tau_0}{\gamma_0}\right) \sin \delta \quad (3)$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

Onde  $\tau_0$  corresponde a amplitude da tensão de cisalhamento,  $\gamma_0$  a amplitude da deformação e  $\delta$  o ângulo de fase.

O gel formado por coagulação enzimática desenvolve de forma rápida a viscoelasticidade e move-se em resposta ligeiramente linear, porém, o ponto de gel pode variar entre instrumentos e/ou suas configurações, e também a aplicação de grandes tensões e deformações devem ser evitados (HORNE; BANKS 2004). O comportamento viscoelástico linear dos materiais é descrito pela variação de  $G'$  e  $G''$  com a frequência, obtendo-se uma curva que é usualmente designada por espectro mecânico. A partir dos espectros mecânicos podem-se obter informações sobre a estrutura dos materiais que são como impressões digitais.

Na FIGURA 4 observam-se espectros mecânicos típicos: para solução diluída, solução concentrada, gel forte e gel fraco.

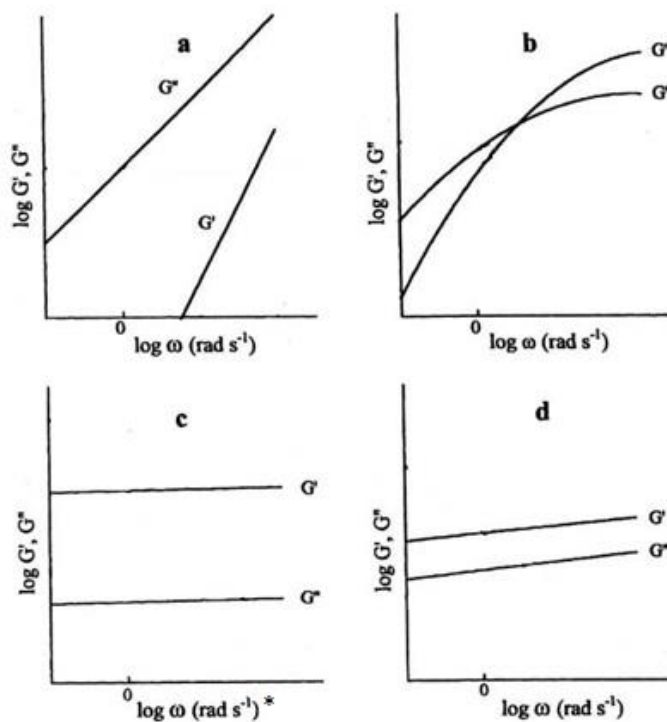


FIGURA 4 - ESPECTROS MECÂNICOS DAS QUATRO PRINCIPAIS CATEGORIAS PARA MATÉRIAS EM GERAL: (a) SOLUÇÃO DILUÍDA; (b) SOLUÇÃO CONCENTRADA; (c) GEL FORTE; (d) GEL FRACO. \*  $\log \omega$  = frequência angular.  
FONTE: ALMEIDA, 2002.

Em soluções diluídas (FIGURA 4 a), o módulo  $G''$  é maior do que  $G'$  em toda a faixa de frequência, mas aproximam-se em frequências mais elevadas. Já em soluções concentradas (FIGURA 4 b) ocorre o cruzamento das curvas de  $G'$  e  $G''$  no meio da faixa de frequência, o que caracteriza, em frequências mais altas, um comportamento mais sólido. Nas FIGURAS (4c e 4d), durante a varredura de frequência, os módulos  $G'$  são maiores que o  $G''$  em toda a faixa de frequência analisada o que, caracteriza a formação de gel. Em géis fortes, os módulos elásticos não variam com a frequência, já os géis fracos são aqueles caracterizados como dependentes da frequência, apresentando curva de  $G'$  maior que  $G''$  mas, não apresentam cruzamento entre eles. Os módulos apresentam uma forte relação com a frequência nas soluções diluídas e concentradas, mas praticamente constante com o gel. Também em géis fortes a razão  $G'/G''$  é superior a 10 e em géis fracos é menor que 10 (CHAMBERLAIN; RAO, 2000; STEFFE, 1996).

A FIGURA 5 apresenta o desenvolvimento de viscoelasticidade para amostra de leite durante coagulação enzimática.

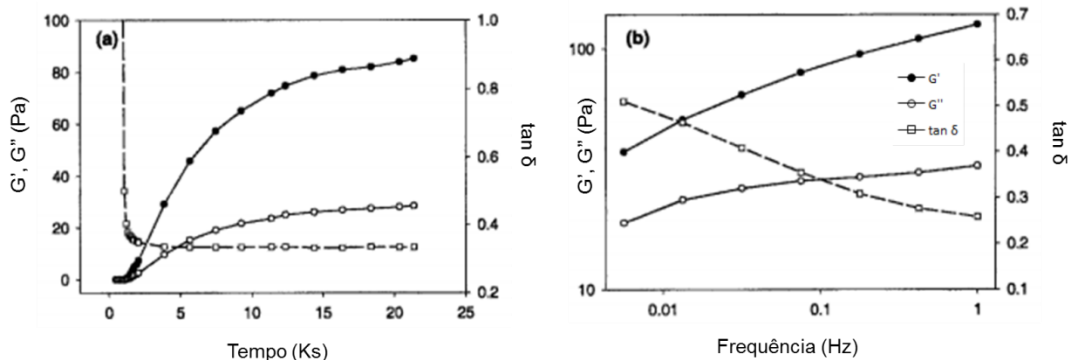


FIGURA 5 – PROPRIEDADES REOLOGIAS DA FORMAÇÃO DE GEL DE LEITE POR COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA, (a) PROPRIEDADES DE GELATINIZAÇÃO EM FUNÇÃO DO TEMPO APÓS ADIÇÃO DE COALHO EM 0,1 Hz (b) PROPRIEDADES REOLÓGICAS EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA. FONTE: LUCEY (2002).

Pode-se observar que com o tempo aumenta a firmeza do gel, como indicado pelo crescimento dos módulos  $G'$  e  $G''$  (FIGURA 5a). Durante a gelatinização ocorre uma fase estacionária (lag), o  $G'$  fica inicialmente sobre o crescimento da viscosidade ou módulo viscoso,  $G''$ , mas rapidamente cruza e domina com o desenvolvimento rápido da elasticidade do gel (LUCEY, 2002; HORNE; BANKS, 2004). Na FIGURA 5b observa-se o comportamento dos módulos  $G'$  e  $G''$ , em função da frequência (Hz), o  $G'$  é superior a  $G''$  ao longo da varredura de frequências o que caracteriza a formação de gel fraco pela dependência da frequência (STEFFE, 1996). A  $\tan \delta$  diminui no ponto de gelificação e atinge um valor próximo de 0,3 (a uma frequência de 0,1 Hz), que dificilmente se altera até o final da coagulação. Os módulos dinâmicos aumentam de forma relativamente rápida no início e tendem lentamente a cessar. O aumento lento nos módulos representa o processo de fusão contínuo das micelas, o que resulta num aumento da área de contato entre as partículas agregadas e, possivelmente, a incorporação de mais partículas à rede, mantendo uma estabilidade (LUCEY, 2002). O valor de TCE (min), de acordo com Lucey et al. (2000) pode ser definido quando o  $G'$  apresenta valor  $\geq 1$  Pa.

Na FIGURA 6 também pode-se observar a variação dos módulos  $G'$  e  $G''$  durante coagulação enzimática em uma amostra de leite.

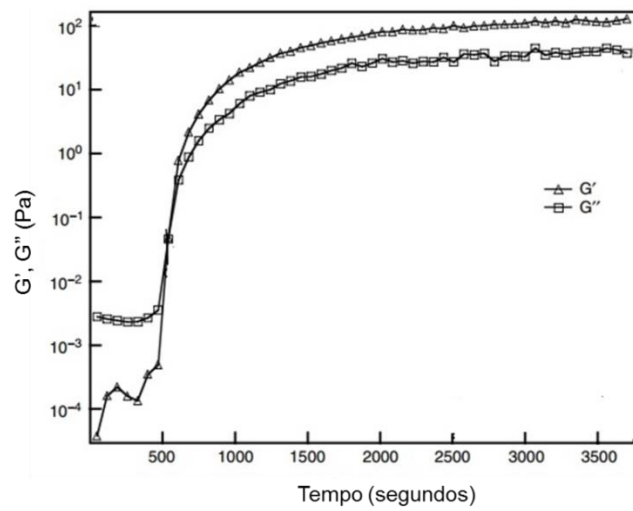


FIGURA 6- ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS DE ARMAZENAMENTO ( $G'$ ) E PERDA ( $G''$ ) DE LEITE EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA  
(FONTE: GUNASEKARAN; AK, 2002).

## **EXPERIMENTO 1: PROPRIEDADES DE COAGULAÇÃO DO LEITE DE VACAS HOLANDEASAS DE ORIGEM ITALIANA E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E AMBIENTAL.**

### **RESUMO**

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar as propriedades de coagulação de leite bovino em dois períodos distintos do ano verão (de julho a setembro) e outono (de setembro a dezembro). Foram coletadas 592 amostras de leite cru de vacas da raça Holandesa de diferentes propriedades localizadas na província de Veneza-Itália. As amostras foram submetidas a determinação de gordura, proteína total, caseína e pH por espectroscopia no infravermelho médio; contagem de células somáticas por fluorescência ótica; propriedades de coagulação do leite, expressas no tempo para o início da coagulação enzimática (TCE, min) e consistência do coágulo após 30 minutos da adição do coalho ( $A_{30}$ , mm) por latodinamografia e o índice de aptidão de coagulação do leite (IAC) calculado a partir dos parâmetros latodinamográficos obtidos. Para verificar as condições ambientais foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) em cada período de coleta. Considerando as amostras coaguladas, não foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de proteína total, caseína, lactose e pH entre as amostras coletadas no verão e outono. Porém, foram significativamente diferentes os resultados para contagem de células somáticas, TCE,  $A_{30}$  e IAC, com resultados inferiores no verão. Do total de amostras de leite, 41,2% não coagularam nos 30 minutos de análise, com maior porcentagem de amostras obtidas no verão. De um modo geral, as amostras analisadas durante essa estação apresentaram resultados inferiores para às PCL (TCE,  $A_{30}$  e IAC) e também foi possível observar que os valores de ITU foram mais elevados que no outono. As médias do ITU foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) nas duas estações,  $73,24 \pm 6,74$  no verão e de  $57,43 \pm 4,99$  no outono. A composição química entre as amostras não coaguláveis (NC) e as amostras coaguláveis (AC) foi comparada em cada período (verão e outono). Entre as amostras NC e AC analisadas no verão, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os teores gordura, proteína total, caseína e pH, e no outono apenas diferenças entre lactose e o pH. Os resultados para a proteína total e caseína não diferiram estatisticamente entre as amostras coaguladas e não coaguladas (coletadas no outono) assim não foi possível atribuir o fraco desempenho das amostras NC ao teor desses componentes. Com os dados obtidos neste trabalho, pode-se constatar que o maior número de amostras NC foi de leites coletados no verão e além disso nessa estação os leites coagulados apresentaram os piores resultados frente às propriedades de coagulação. Leites com essa característica não são adequados para produção de queijos e sim para produção de leite fluido ou para outros derivados nos quais a coagulação enzimática não faça parte do processo.

**Palavras-chaves:** Coagulação do leite. Latodinamografia. Queijos.



# COAGULATION PROPERTIES OF MILK FROM HOLSTEIN CATTLE OF ITALIAN ORIGIN AND THEIR RELATIONSHIP WITH THE PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS

## ABSTRACT

This research was carried out with the objective of investigating the coagulation properties of cow's milk in two distinct periods: summer (from July to September) and autumn (from September to December). A total of 592 samples of raw milk from Holstein cows were collected, coming from different properties located in the province of Venice-Italy. The samples were submitted to the determination of fat, total protein and casein contents and pH value by medium infrared spectroscopy; the somatic cell count by optical fluorescence; and the milk coagulation properties expressed as the milk rennet coagulation time (RCT, min) and curd firmness 30 minutes after the addition of the rennet ( $A_{30}$ , mm), by lactodynamography. The milk coagulation aptitude index (IAC) was calculated as from the lactodynamographic parameters obtained. The temperature-humidity index (THI) was also calculated for each collection period in order to verify the environmental conditions. Considering the coagulated samples, no significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the samples collected in the summer and autumn with respect to total protein, casein, lactose and pH value. However, significant differences were found for the somatic cell counts, RCT,  $A_{30}$  and IAC, with inferior results in the summer. Of the total number of milk samples, 41.2% coagulated in the 30 minutes of analysis, with a greater percentage of these samples having been obtained in the summer. In general the samples analyzed in the summer showed inferior results for MCP, (RCT,  $A_{30}$  and IAC) and superior results for THI as compared to those in the autumn. The mean values for THI were statistically different ( $p < 0.05$ ) between the two seasons,  $73.24 \pm 6.74$  in the summer and  $57.43 \pm 4.99$  in the autumn. The chemical compositions of the non-coagulating (NC) and coagulating (AC) samples were compared for each period (summer and autumn). Of the NC and AC samples analyzed in the summer, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found for the fat, total protein and casein contents and for the pH value, and in the autumn, only for the lactose content and pH value. The results for the total protein and casein contents did not differ significantly between the non-coagulating and coagulating samples (collected in the autumn), and hence the weak performance of the NC samples could not be attributed to the contents of these components. With the data obtained in this study, it can be seen that the larger number of NC samples were collected in the summer, and also that the milk samples collected in this season presented the worst results for the coagulation parameters. Milk samples with these characteristics are not adequate for cheese production but are adequate for liquid milk production or for other dairy products for which enzymatic coagulation is not part of the process.

**Keywords:** Milk coagulation. Lactodynamography. Cheeses.

## 5 INTRODUÇÃO

Com relação à qualidade do leite, do ponto de vista legal e prático, dois aspectos são considerados: composição química e características higiênico-sanitárias (BRITO; BRITO, 2004). Conhecer essas características é essencial para o processamento, controle de qualidade, bem como para atender aos padrões exigidos pela legislação.

A fabricação de queijos requer a coagulação do leite, um processo que envolve uma série de alterações físico-químicas, especialmente na micela de caseína, resultando na formação de um gel. Para indústria de laticínios, a quantidade e a qualidade de queijo obtido por unidade de volume de leite processado estão diretamente ligadas ao rendimento e ao lucro da empresa (BONFATTI et al., 2014).

As propriedades de coagulação do leite (MCP) são relevantes para leites destinados à produção de queijos, sendo consideradas como um bom indicador para o rendimento de fabricação (SUMMER et al., 2002; CASSANDRO et al., 2008; FREDERIKSEN et al., 2011; BITTANTE et al., 2012). As principais características estudadas com relação à coagulação do leite são: tempo para o início da coagulação enzimática (TCE, min), o tempo necessário em minutos para o gel atingir uma consistência com amplitude de 20 mm ( $k_{20}$ ) e o  $A_{30}$  que está relacionado com a firmeza ou consistência do coágulo após 30 minutos da adição do coalho ou enzima coagulante.

Os leites que não coagulam (NC) ou de coagulação lenta são um prejuízo para a indústria de laticínios. Sendo assim, conhecer o perfil de coagulação do leite é importante para indústria, pois desta forma pode-se direcionar o leite para produção de queijos ou de outros produtos (FREDERIKSEN et al., 2011).

Os valores de TCE,  $k_{20}$  e  $A_{30}$  são obtidos separadamente, porém quando combinados expressam a qualidade do leite com relação à coagulação. Para facilitar essa informação Penasa et al. (2015) combinaram dois parâmetros (TCE e  $A_{30}$ ) para formar um índice, denominado de índice de aptidão do leite a coagulação (IAC). Segundo os autores o IAC poderia ser adotado pela indústria de laticínios como um indicador das propriedades de coagulação do leite (PCL) para premiar ou penalizar os produtores de leite em sistemas de pagamento por qualidade. De acordo com Bittante; Penasa e Cecchinato (2012) na Itália alguns laticínios já tem adotado as PCL nos sistemas de pagamento do leite aos produtores, porém considerando os dois parâmetros, TCE e  $A_{30}$  e agora podendo fazer uso do novo índice: o IAC.

As propriedades fundamentais do leite para a fabricação de queijos são: (1) uma boa reatividade com a enzima coagulante, (2) elevada capacidade para formar uma coalhada firme e (3) boa capacidade de sinérese (expulsão de soro) (FORMAGGIONI et al., 2001).

Diversos fatores podem influenciar a coagulação como: composição química do leite, principalmente no que diz respeito à caseína e suas frações, tipo e concentração da enzima coagulante, temperatura de processamento e células somáticas (POLITIS; NG-KWAI-HANG 1988; O'CALLAGHAN et al., 2001; SUMMER et al., 2002). A composição do leite pode variar mesmo entre animais da mesma raça e fatores relacionados com o manejo, genética, nutrição e meio ambiente afetam os componentes básicos de leite.

O estresse térmico apresenta impacto negativo sobre a produção e a composição do leite (ZIMBELMAN; COLLIER; BILBY, 2013). Fagan et al. (2010) avaliaram a composição química do leite, em dois rebanhos, em diferentes estações do ano e encontraram os melhores resultados, tanto para o volume como para a composição química do leite, para as amostras coletadas durante o inverno e o outono. Isso ocorre porque a temperatura associada à umidade, conhecida como índice de temperatura e umidade (ITU) é menor nesses períodos. O ITU, representa os efeitos combinados da temperatura e umidade do ar, sendo associado ao estresse térmico (ARMSTRONG, 1994; BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007). Este índice é utilizado para avaliar o impacto do estresse térmico sobre vacas leiteiras (BOURAOUI et al., 2002; BROWN-BRANDL et al., 2003) pois, está relacionado com a diminuição da produção de leite e altera sua composição (SCHNEIDER; BEEDE; WILCOX, 1998; BOURAOUI et al., 2002; WEST; MULLINIX; BERNARD, 2003; BOHMANOVA; MISZTAL; COLE, 2007; GANTNER, 2011).

O objetivo principal dessa pesquisa foi avaliar a composição química, teor de células somáticas, as propriedades de coagulação do leite (PCL) e a aptidão do leite a coagulação (IAC) de leites de vacas da raça Holandesa de seis diferentes propriedades, em dois períodos distintos (verão e outono) localizadas na província de Veneza-Itália, bem como suas correlações com o ITU.

## 5.1 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1.1 Material

Foram avaliadas 592 amostras de leite de vacas da raça Holandesa, em sistema de confinamento proveniente de seis propriedades localizadas na província de Veneza-Itália no período de julho a novembro (entre verão e outono) de 2015. As amostras foram coletadas em frascos de 40 mL acrescidas do conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3- propanodiol da Knoll Pharmaceuticals, Nottingham, UK) para auxiliar na preservação das amostras na concentração de 250  $\mu\text{L} \cdot 50 \text{ mL}^{-1}$  de leite, e acondicionadas em caixas de poliestireno expandido, com gelo reciclável, para manter a temperatura próxima a 4 °C. A adição de conservante Bronopol (não apresenta efeitos prejudiciais sobre confiabilidade nas medidas das PCL (DAL ZOTTO et al. 2008). As seis propriedades foram identificadas como: PA, PB, PC, PD, PE e PF, e para identificar verão e outono, foram acrescentadas as letras V (verão) e O (outono) às siglas. Foram coletadas amostras de 34, 80, 70, 66, 31 e 53 animais em lactação em cada propriedade, respectivamente. As análises foram realizadas no laboratório de controle de qualidade de leite da *Associazione Regionale Allevatori del Veneto* (ARAV) na cidade de Padova-Itália.

### 5.1.2 Métodos

#### 5.1.2.1 Determinação da gordura, proteína total, caseína, pH e contagem de células somáticas

O teor de gordura, proteína total, caseína e pH foram determinados eletronicamente absorção no Infravermelho médio com Transformada de Fourier, utilizando o equipamento MilkoScan FT6000 (Foss Electric A/S, Dinamarca) (IDF, 2000). A contagem de células somáticas no leite foi executada pelo instrumento Fossomatic 5000 (Foss Electric A/S, Dinamarca) que é um contador eletrônico de células por fluorescência. A contagem de células é feita pelo método conhecido como citometria de fluxo. Para contagem das células o instrumento requer o uso do corante específico brometo de etídio que cora o DNA das células brancas do leite. Um pequeno montante de líquido carreador conduz as células coradas através de uma câmara denominada “flow cell”. Devido a ação do corante fluorescente, cada célula que passa através do feixe de luz, produz um pequeno rompimento. A luz passa através de uma série de filtros ópticos e lentes em um determinado comprimento de onda. O

rompimento de luz é transformado em pulso elétrico que são amplificados e filtrados eletronicamente. O computador conta os pulsos elétricos que representa as células brancas do leite (leucócitos) e as células de descamação do úbere do animal. Para as análises descritas às amostras eram previamente aquecidas a 40°C durante 15 minutos (em banho termostatizado) e na sequência levadas aos respectivos equipamentos para a análise (IDF, 2006).

Os valores de CCS foram transformados, em uma escala logarítmica (Equação 5), para escore de células somáticas (ECS), a fim de alcançar a normalidade e homogeneidade das variâncias.

$$ECS = 3 + \log_2 (CCS/100) \quad (5)$$

#### 5.1.2.2 Análise das propriedades de coagulação do leite (PCL)

A determinação das PCL foi realizada por meio do Formagraph (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark, FIGURA 7) de acordo com Penasa et al. (2015). Para cada amostra foi utilizado 10 mL de leite, inseridos em cada unidade de medida, em duplicata. Primeiramente as amostras eram aquecidas a 35 °C por 15 minutos em um bloco de aquecimento com termostato e na sequência foram adicionados 200 µL de uma solução de 1,2% de coalho (Naturen Plus 215 IMCUmL<sup>-1</sup> - *International Milk Clotting Units*), composto por 80% de quimosina e 20% de pepsina, com IMCU final de 0,051 IMCUmL<sup>-1</sup> e a análise era iniciada. As medidas da PCL foram conduzidas por 30 minutos após a adição do coalho. Os parâmetros registrados foram o TCE (min), definido como o intervalo de tempo a partir da adição de coalho, para o início da coagulação; o k<sub>20</sub> que representa o tempo necessário em minutos para o gel atingir uma consistência com amplitude de 20 mm e o A<sub>30</sub>, definido como a largura, em milímetros, do diagrama no final da análise.

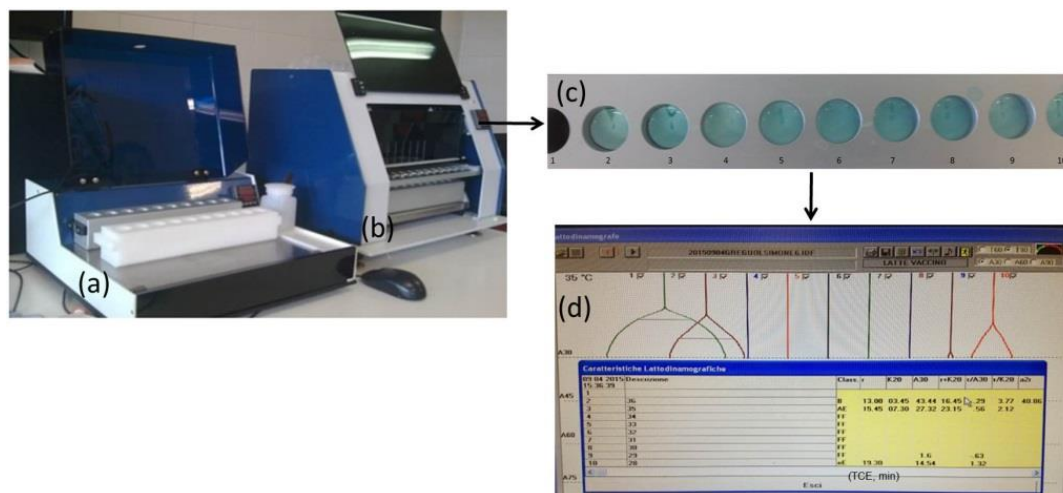


FIGURA 7- FORMAGRAPH (FOSS ELECTRIC A/S, DINAMARCA) – MÓDULOS: DE AQUECIMENTO (a) E DE ANÁLISE (b); BLOCO DE AQUECIMENTO APÓS ANÁLISE (c); PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS REFERENTE ÀS AMOSTRAS DA FIGURA 7c (d).  
FONTE: O autor (2015)

### 5.1.2.3 Determinação do índice de aptidão de coagulação do leite (IAC)

O índice de aptidão de coagulação do leite foi calculado de acordo com Penasa et al. (2015), Equação 1.

$$IAC = 100 + (a_{30} - \text{média}_{a_{30}})/DP_{a_{30}}*2,5 - (TCE - \text{média}_{TCE})/DP_{TCE}*2,5 \quad (1)$$

Sendo:  $a_{30}$  - a firmeza ou consistência do coágulo que se determina em milímetros (mm); DP – desvio padrão e TCE - tempo de coagulação enzimática (min).

### 5.1.2.4 Índice de temperatura e umidade (ITU)

Os índices de temperatura e umidade foram calculados de acordo com a Equação 6 da *National Research Council* (NRC, 1971):

$$ITU = (1,8 \times T + 32) - (0,55 - 0,0055 \times RH) \times (1,8 \times T - 26) \quad (6)$$

Sendo: T - temperatura (°C) e RH – umidade relativa (%). Os dados de temperatura e umidade relativa foram obtidos da web site oficial: <http://www.ilmeteo.it>.

### 5.1.3 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados em valores médios de duplicatas, seguido do seu desvio padrão ( $\pm$  DP) e em alguns casos o valor mínimo e máximo, alocados abaixo da média.

O teste t foi realizado para detectar diferenças significativas entre os leites coletados e analisados no verão e no outono. A análise de correlação de Pearson (r) entre as diferentes variáveis de resposta foi aplicada para avaliar a correlação entre a gordura, proteína total, caseína, lactose, pH, escore de células somáticas (ECS), índice de temperatura e umidade (ITU), tempo de coagulação enzimática (TCE),  $A_{30}$  e o índice de aptidão de coagulação do leite (IAC). A significância estatística para todas as amostras foi obtida calculando-se o valor p, ao nível de significância de 5%. A análise estatística foi implementada no software STATISTICA v. 13.2 (STATSOFT Inc., Tulsa, Okla., U.S.A.). Como foram observadas diferenças em função do período de análise, foi aplicado o Modelo Linear Generalizado (MLG), para verificar a influência do período de coleta, das propriedades e a interação entre eles para cada variável dependente. As variáveis dependentes que apresentaram distribuição normal foram analisadas utilizando-se função de ligação de identidade. As análises pelo MLG foram realizadas no Software SPSS versão 22.

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.2.1 Composição química, pH, escore de células somáticas, propriedades de coagulação do leite, índice de aptidão de coagulação e índice de temperatura e umidade

Os valores médios da composição química (gordura, proteína total, caseína e lactose), pH, ECS, dos parâmetros latodinamográficos e do ITU das amostras estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2- VALORES MÉDIOS DAS VARIÁVEIS ANÁLISADAS, DOS PARAMETROS LATODINAMOGRÁFICOS E DO ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU) DAS AMOSTRAS

Propriedades Rurais*	Parâmetros analisados									
	Gordura g.100mL <sup>-1</sup>	PT** g.100mL <sup>-1</sup>	CN** g.100mL <sup>-1</sup>	Lactose g.100mL <sup>-1</sup>	ECS**	pH	TCE** min	A <sub>30</sub> ** mm	IAC**	ITU
<b>Verão</b>										
<b>PAV</b>	3,45 ± 0,36	3,59 ± 0,22	2,84 ± 0,20	4,89 ± 0,21	3,66 ± 1,38	6,56 ± 0,06	22,84 ± 3,71	14,40 ± 11,27	96,66 ± 3,54	76,47 ± 0,03
	2,91 - 3,92	3,21 - 3,81	2,47 - 3,05	4,48 - 5,16	1,91 - 5,76	6,45 - 6,62	16,38 - 28,25	1,80 - 35,29	92,30 - 103,61	76,45 - 76,50
<b>PBV</b>	4,16 ± 0,77	3,38 ± 0,47	2,58 ± 0,37	4,82 ± 0,28	4,05 ± 3,44	6,48 ± 0,06	21,08 ± 4,83	14,40 ± 10,14	97,80 ± 3,90	81,51 ± 0,02
	2,94 - 6,53	2,42 - 4,21	1,86 - 3,27	3,89 - 5,23	-2,06 - 10,45	6,38 - 6,62	8,88 - 28,15	2,41 - 43,21	92,41 - 108,50	81,49 - 81,53
<b>PCV</b>	4,29 ± 0,66	3,49 ± 0,42	2,68 ± 0,34	4,76 ± 0,17	2,98 ± 1,73	6,66 ± 0,05	22,44 ± 4,47	15,00 ± 10,45	97,26 ± 4,15	81,22 ± 0,03
	3,58 - 6,32	3,08 - 4,25	2,25 - 3,30	4,30 - 4,91	0,88 - 5,90	6,60 - 6,75	13,30 - 28,38	2,71 - 32,70	92,35 - 104,61	81,19 - 81,24
<b>PDV</b>	4,24 ± 0,81	3,30 ± 0,40	2,55 ± 0,33	4,81 ± 0,22	4,58 ± 2,07	6,61 ± 0,06	20,97 ± 4,18	18,74 ± 10,11	98,40 ± 3,57	71,10 ± 0,01
	2,84 - 6,11	2,45 - 4,39	1,85 - 3,46	4,25 - 5,15	0,36 - 7,92	6,46 - 6,72	14,00 - 27,58	1,93 - 38,28	92,36 - 103,86	71,08 - 71,11
<b>PEV</b>	3,60 ± 0,92	2,96 ± 0,40	2,24 ± 0,30	4,74 ± 0,26	4,91 ± 2,80	6,60 ± 0,11	17,81 ± 5,18	20,12 ± 11,38	100,32 ± 4,29	71,08 ± 0,00
	2,58 - 5,82	2,59 - 3,69	1,92 - 2,77	4,17 - 5,14	0,60 - 10,60	6,32 - 6,79	9,45 - 25,38	5,70 - 42,96	94,28 - 108,18	71,08 - 71,08
<b>PFV</b>	4,10 ± 0,97	3,52 ± 0,40	2,75 ± 0,32	4,77 ± 0,23	3,28 ± 2,05	6,53 ± 0,08	20,32 ± 5,15	20,58 ± 13,03	99,22 ± 4,91	64,63 ± 0,04
	2,54 - 6,72	2,71 - 4,62	2,09 - 3,56	4,04 - 5,09	-0,64 - 8,63	6,30 - 6,77	9,80 - 28,30	2,65 - 50,53	92,38 - 108,72	64,59 - 64,66
<b>Outono</b>										
<b>PAO</b>	3,96 ± 0,71	3,40 ± 0,44	2,67 ± 0,34	4,79 ± 0,21	2,97 ± 2,00	6,53 ± 0,06	21,26 ± 4,48	15,91 ± 10,02	95,59 ± 2,43	70,39 ± 0,02
	3,01 - 5,86	2,70 - 4,11	2,04 - 3,19	4,39 - 5,09	-0,47 - 7,59	6,43 - 6,67	11,65 - 28,15	2,41 - 39,90	91,99 - 100,59	70,37 - 70,40
<b>PBO</b>	3,71 ± 0,91	3,57 ± 0,50	2,79 ± 0,39	4,77 ± 0,20	3,68 ± 2,45	6,55 ± 0,06	17,76 ± 5,08	26,94 ± 13,48	101,52 ± 4,61	54,04 ± 0,04
	2,32 - 6,05	2,79 - 5,12	2,20 - 3,99	4,35 - 5,23	-0,18 - 9,60	6,44 - 6,71	8,73 - 27,50	3,65 - 56,59	92,93 - 110,87	54,00 - 54,08
<b>PCO</b>	3,31 ± 0,64	3,47 ± 0,43	2,70 ± 0,33	4,80 ± 0,17	2,63 ± 1,80	6,61 ± 0,06	15,87 ± 5,49	32,80 ± 13,62	103,41 ± 4,83	57,34 ± 0,03
	1,96 - 4,68	2,72 - 4,77	2,09 - 3,66	4,24 - 5,15	-0,06 - 6,30	6,48 - 6,79	8,30 - 28,30	2,30 - 52,19	92,32 - 109,82	57,31 - 57,38
<b>PDO</b>	3,97 ± 0,47	3,53 ± 0,32	2,71 ± 0,24	4,81 ± 0,17	4,21 ± 1,75	6,57 ± 0,06	20,25 ± 4,56	22,03 ± 12,11	99,50 ± 4,19	57,24 ± 0,00
	2,97 - 5,04	2,93 - 4,44	2,20 - 3,41	4,56 - 5,09	1,44 - 9,21	6,46 - 6,65	12,45 - 28,08	4,93 - 43,75	92,88 - 106,76	57,24 - 57,24
<b>PEO</b>	3,29 ± 0,56	3,01 ± 0,30	2,31 ± 0,22	4,83 ± 0,18	3,64 ± 2,17	6,61 ± 0,05	18,17 ± 5,53	19,68 ± 10,51	100,07 ± 4,35	57,19 ± 0,01
	1,85 - 4,54	2,60 - 3,68	2,01 - 2,79	4,44 - 5,08	-0,06 - 8,43	6,51 - 6,68	10,08 - 27,58	3,98 - 35,01	93,06 - 106,52	57,19 - 57,24
<b>PFO</b>	4,16 ± 0,82	3,66 ± 0,44	2,87 ± 0,36	4,80 ± 0,17	2,98 ± 2,34	6,56 ± 0,09	16,78 ± 4,94	32,79 ± 14,32	102,98 ± 4,60	54,02 ± 0,02
	2,46 - 6,42	2,66 - 4,50	2,04 - 3,59	4,27 - 5,10	-0,64 - 9,27	6,32 - 6,72	8,80 - 28,30	2,46 - 52,76	92,35 - 109,78	54,00 - 54,04

\*Propriedades rurais: PA, PB, PC, PD, PE e PF (letra V para identificar o verão e O para o outono); \*\*PT (proteína total); CN (caseína); ECS (escore de células somáticas); TCE (tempo de coagulação enzimática); A<sub>30</sub> (firmeza do coágulo); IAC (índice de aptidão de coagulação do leite). Valores apresentados: médias ± DP com os valores mínimos e máximos abaixo. Número de amostras=349.

Os valores referentes à composição química, pH e ECS, encontram-se próximos aos citados na literatura para leites de vacas Holandesas Italianas (CASSANDRO et al., 2008; TIEZZI et al., 2013). Com relação às propriedades de coagulação, observou-se de forma geral que as amostras analisadas durante o verão apresentaram resultados maiores para TCE e



inferiores para  $A_{30}$  e IAC e, nesse período os valores de ITU foram mais elevados. Na FIGURA 8 pode-se observar que a porcentagem de amostras coaguladas foi superior durante o outono (com valores de ITU menores) e no verão, apenas a propriedade (PF) apresentou o número de amostras coaguladas (70,50%) próximas às analisadas durante o outono (75,47%). Essa diferença pode estar em parte associada às variações do ITU, observadas durante os períodos de análise, com médias de  $73,24 \pm 6,74$  (verão) e de  $57,43 \pm 4,99$  (outono), (TABELA 4).

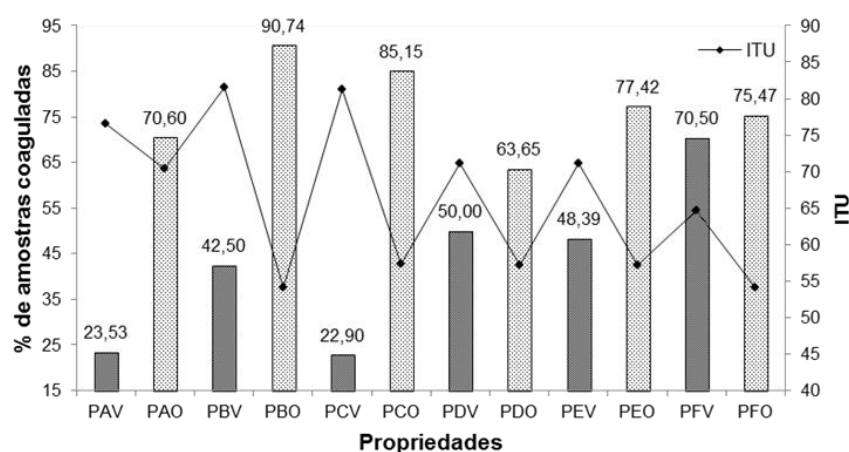


FIGURA 8 – LEITES COAGULADOS NOS DOIS PERÍODOS DE ESTUDO: VERÃO E OUTONO  
- Propriedades rurais: PA, PB, PC, PD, PE e PF (letra V: verão e O: outono); ITU (índice de temperatura e umidade)

O ITU pode ser utilizado para determinar a influência da temperatura ambiente na produtividade das vacas leiteiras (GANTNER et al., 2011). Armstrong (1994) classificou o estresse térmico, sentido pelos animais, em função da variação do ITU em leve entre 72-78, moderado entre 79-89 e severo entre 90-99. Já, valores abaixo de 72 são caracterizados por um ambiente livre de estresse provocado pelo calor e das consequências provocadas por ele. Porém, de acordo com Bernabucci et al. (2010), em pesquisa realizada com vacas Holandesas Italianas, as perdas na produção de leite foram percebidas com ITU próximo a 68. O estresse por calor também pode alterar a composição do leite e a frequência da mastite, o que pode comprometer a coagulação (RODRIGUEZ et al., 1985, DU PREEZ et al., 1990) e consequentemente o IAC.

Do total de amostras analisadas, 41,2% apresentaram leite NC, ou seja, não coagularam dentro dos 30 minutos de análise e a informação sobre o  $k_{20}$  foi ausente para 22% dos leites analisados. De acordo com os resultados, considerando os períodos de análise, as amostras analisadas no verão tiveram a maior porcentagem de NC (56,6%) comparado às amostras do outono (20,9%). A porcentagem de amostras NC foi elevada comparado aos

9,7% relatados por Cassandro et al. (2008), analisadas durante o inverno e primavera, aos 11,5% relatados por Pretto et al (2011) e, aos 12,9% citados por Toffanin et al. (2015) analisadas durante o inverno. Ambas as pesquisas foram realizadas com leites de vacas individuais da raça Holandesa Italiana. Em todas as propriedades as maiores porcentagens de amostras NC foram referentes aos leites coletados durante o verão, porém, provavelmente algumas dessas amostras coagulariam após 30 minutos. Porém neste estudo a análise foi interrompida após esse tempo, pois durante a fabricação de queijos na Itália, a coalhada é usualmente cortada em até 30 minutos após a adição do coalho (CASSANDRO et al, 2008). Para indústria de queijos, longo tempo de coagulação é resultado de reduzida velocidade de formação do coágulo e fraca consistência final do mesmo, o que implica em perdas no rendimento (DEL PRATO, 2001; BITTANTE et al., 2012).

O  $k_{20}$  esteve ausente em 22% das amostras. Esse índice só está presente em leites que durante a coagulação atingem 20 mm de firmeza da coalhada o que não acontece em leites NC ou com coagulação tardia. O aumento da frequência de amostras de leite com longo valor de TCE tem tornado o traço  $k_{20}$  decrescente de utilidade pois, muitas amostras não apresentam esse parâmetro. Penasa et al. (2016) relataram que em 26% das amostras analisadas o  $k_{20}$  esteve ausente e, além disso, os valores  $k_{20}$  são caracterizados por menor repetibilidade e reprodutibilidades em relação ao TCE, o que tem contribuído para a exclusão desse atributo em muitas pesquisas (BITTANTE, 2011). A PCL leva em consideração o TCE (min), o  $k_{20}$  (mm) e  $A_{30}$  (mm). Diante do exposto e para concentrar as PCL em uma única resposta, Penasa et al. (2015) propuseram um novo parâmetro: índice de aptidão de coagulação do leite (IAC), índice que considera apenas o TCE e  $A_{30}$ , facilitando a interpretação. De acordo com as considerações expostas, para análise estatística das PCL, foram excluídas as amostras NC, bem como foram retirados os valores de  $k_{20}$ .

Na TABELA 3 encontra-se a análise de correlação de Pearson, na qual pode-se observar que a gordura, proteína total, caseína e lactose com relação ao ITU apresentaram correlação significativa ( $p < 0,05$ ), porém baixa. Favoráveis parâmetros latodinamográficos foram associados a valores de ITU mais baixos (0,3119; -0,4048 e -0,3845 para TCE,  $A_{30}$  e IAC, respectivamente), não houve correlação entre o ITU com pH e ECS.

TABELA 3– CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R<sup>2</sup>) ENTRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH, ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU) E PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS

Variáveis	Gordura	PT*	CN*	Lactose	pH	ESC	ITU	TCE*	A <sub>30</sub> *	IAC*
Gordura, g.100mL <sup>-1</sup>	<b>1,0000</b>	0,2633	0,2414	0,0000	0,0043	0,0612	0,0367	0,0056	0,0260	0,0119
PT, g.100mL <sup>-1</sup>	0,5131**	<b>1,0000</b>	0,9835	0,0743	0,0041	0,0392	0,0160	0,0061	0,1145	0,0439
CN, g.100mL <sup>-1</sup>	0,4914**	0,9917**	<b>1,0000</b>	0,1520	0,0028	0,0191	0,0247	0,0076	0,1253	0,0482
Lactose, g.100mL <sup>-1</sup>	-0,0064	0,2726**	0,3899**	<b>1,0000</b>	0,0041	0,1402	0,0745	0,0079	0,0462	0,0180
pH	-0,0658	-0,0637	-0,0526	0,0641	<b>1,0000</b>	0,0013	0,0093	0,0031	0,0045	0,0043
ESC	0,2474**	0,1981**	0,1381**	-0,3743**	-0,0362	<b>1,0000</b>	0,0092	0,0172	0,0142	0,0148
ITU	0,1916**	-0,1264**	-0,1571**	-0,2730**	-0,0964	0,0957	<b>1,0000</b>	0,0973	0,1638	0,1479
TCE, min	-0,0746	-0,0780	-0,0874	-0,0888	-0,0556	0,1312**	0,3119**	<b>1,0000</b>	0,8067	0,9283
A <sub>30</sub> , mm	0,1613**	0,3383**	0,3540**	0,2150**	0,0671	-0,1193**	-0,4048**	-0,8982**	<b>1,0000</b>	0,9277
IAC	0,1092**	0,2094**	0,2195**	0,1341**	0,0654	-0,1218**	-0,3845**	-0,9635**	0,9631**	<b>1,0000</b>

\*PT (proteína total); CN (caseína); TCE (tempo de coagulação enzimática); A<sub>30</sub> (firmeza da coalhada); IAC (índice de aptidão de coagulação do leite). \*\*Correlação significativa ( $p < 0,05$ ); correlação de Pearson (r) abaixo da diagonal e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) acima da diagonal. Número de amostras=349.

Assim de acordo com os resultados obtidos neste trabalho e, de acordo com a literatura (FAGAN et al., 2010; ZIMBELMAN; COLLIER; BILBY, 2013) o ITU, que foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) nos períodos de análise (verão e outono), parece ter influenciado a composição química do leite e consequentemente as propriedades de coagulação (TABELA 4).

TABELA 4- COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH, ECS, PARÂMETROS LATODINAMOGRAFICOS E ITU DAS AMOSTRAS DE LEITE COLETADAS NO VERÃO E OUTONO PELO USO TESTE t

Períodos	Variáveis									
	Gordura g.100mL <sup>-1</sup>	PT* g.100mL <sup>-1</sup>	CN* g.100mL <sup>-1</sup>	Lactose g.100mL <sup>-1</sup>	pH	ECS*	TCE* min	A <sub>30</sub> * mm	IAC*	ITU*
Verão	4,08 ± 0,84 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,44	2,61 ± 0,36	4,79 ± 0,24	6,56 ± 0,09	3,91 ± 2,50 <sup>a</sup>	20,76 ± 4,84 <sup>a</sup>	17,35 ± 11,21 <sup>b</sup>	98,46 ± 4,12 <sup>b</sup>	73,24 ± 6,74 <sup>a</sup>
Mín. - Máx.	2,54 - 6,72	2,42 - 4,62	1,85 - 3,56	3,89 - 5,23	6,30 - 6,67	-2,06 - 10,60	8,88 - 28,38	0,90 - 50,53	92,30 - 108,72	64,66 - 81,53
Outono	3,72 ± 0,80 <sup>b</sup>	3,48 ± 0,46	2,71 ± 0,37	4,80 ± 0,18	6,57 ± 0,07	3,27 ± 2,18 <sup>b</sup>	17,86 ± 5,32 <sup>b</sup>	26,75 ± 14,12 <sup>a</sup>	101,16 ± 4,97 <sup>a</sup>	57,43 ± 4,99 <sup>b</sup>
Mín. - Máx.	1,85 - 6,42	2,60 - 5,12	2,01 - 3,99	4,24 - 5,23	6,32 - 6,79	-0,64 - 9,60	8,30 - 28,30	2,30 - 56,59	91,99 - 110,87	50,04 - 70,40

<sup>a,b</sup> Médias com diferentes letras na mesma coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ); \* PT (proteína Total); CN (caseína); ECS (escore de células somáticas); TCE (tempo de coagulação enzimática); A<sub>30</sub> (firmeza da coalhada); IAC (índice de aptidão de coagulação do leite) e ITU (índice de temperatura e umidade).

Os teores de proteína total, caseína, lactose e o pH não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias das amostras analisadas durante o verão e outono, porém, entre as demais variáveis, houve diferença significativa. O teor de gordura foi maior nas amostras analisadas durante o verão, e foi nesse período que o ITU apresentou média de 73,24, mas alcançou valor máximo de 81,53 (com temperaturas entre 19°C e 31°C). Algumas raças sofrem menor influência das condições ambientais em relação à quantidade e qualidade do leite produzido, mas, de acordo com Miranda e Freitas (2009) a temperatura crítica, ou seja, a temperatura acima da qual começa a diminuir a produção de leite está entre 24 e 26°C para a raça Holandesa e acima de 29,5°C para Pardo-Suíça. Assim, o maior teor de gordura encontrado nas amostras analisadas no verão pode estar relacionado ao menor volume de leite

produzido nesse período, em decorrência do estresse térmico, o que provoca o aumento do teor de gordura pela concentração da mesma (STELZER et al., 2009).

As amostras de leite coletadas no verão apresentaram menor porcentagem de proteína total e caseína que as amostras analisadas durante o outono, fator que pode estar associado à questão fisiológica (maior sensibilidade dos animais no verão) e à alimentação (STELZER et al., 2009), porém as diferenças foram pequenas e não significativas (TABELA 4). O teor de caseína é um dos fatores que contribui de forma positiva para início da coagulação enzimática e ainda mais na textura final da coalhada (WEDHOLM et al., 2006; HALLÉN et al., 2007). Porém, não foi encontrada correlação significativa entre a caseína com TCE (-0,0874, TABELA 3) por outro lado, com o  $A_{30}$  a correlação foi significativa e favorável, mas baixa ( $0,3540$   $p < 0,05$ , TABELA 3). Os valores encontrados foram próximos aos encontrados por Cassandro et al. (2008) e Tiezzi et al. (2015) que relataram correlação negativa entre caseína e TCE (-0,19 e -0,021) mas não significante e entre  $A_{30}$  e a caseína (0,320 e 0,346), respectivamente.

Com relação à PCL, de acordo com Zannoni e Annibaldi (1981) um leite é considerado ideal quando apresenta valor de TCE entre, aproximadamente, 11 a 18 min e  $A_{30}$  de 20 a 40 mm. No outono as amostras apresentaram melhor resposta com relação ao tempo de coagulação (TCE),  $17,86 \pm 5,32$  min e firmeza do gel ( $A_{30}$ ) de  $26,75 \pm 14,12$  mm com valores médios próximos do ideal e, no verão a média para TCE foi de  $20,76 \pm 4,84$  min e de  $17,35 \pm 11,21$  mm para o  $A_{30}$ . (TABELA 4). O TCE e  $A_{30}$  tiveram uma forte e negativa correlação (-0,8982, TABELA 3), o mesmo relatado por Ikonen et al. (2004) e Tiezzi et al. (2015) confirmando que, quando o TCE diminui o  $A_{30}$  aumenta. Essa correlação é esperada entre eles porque estes traços são medidos em etapas consecutivas durante o processo de coagulação. Assim, se o leite inicia a coagulação em um curto período de tempo, tem mais tempo para firmar a coalhada e, assim terá melhor capacidade de coagulação, em geral com maiores valores médios de  $A_{30}$ . Por outro lado, se o leite demora mais tempo para coagular, a coalhada terá menos tempo para endurecimento e consequentemente o gel será mais fraco (CECCHINATO et al., 2011).

De Marchi et al. (2008) relataram valores de TCE médios (amostras analisadas durante o verão) de 18,4 min e  $A_{30}$  de 18,9 mm; Cassandro et al. (2008) média de 16,9 min para TCE e  $A_{30}$  de 32,0 mm (período de análise inverno e primavera); Penasa et al. (2014) (pesquisa realizada no outono e inverno), o valor médio para TCE foi 21,0 min com  $A_{30}$  de 20,08 mm e Tiezzi et al. (2015) relataram 18,9 min para TCE e 23,0 mm para o  $A_{30}$ , para análises

realizadas no outono. Todas as pesquisas foram conduzidas com vacas da raça holandesa, e os resultados são próximos, mas com variações consideráveis. A raça holandesa é conhecida pela elevada produção de leite, baixo conteúdo de proteína e fraco desempenho com relação à propriedade de coagulação quando comparadas com raças as Jersey e Pardo-Suíça (AULDIST et al., 2004; DE MARCHI et al., 2007), bem como sentem mais os efeitos do clima. Entretanto é a principal raça de gado de leite na Itália, com predominância na região norte do país (PRETTO et al., 2012).

O IAC, que foi desenvolvido como um novo índice padrão para agrupar o TCE e  $A_{30}$ , variou de acordo com os valores desses parâmetros, e dessa forma a resposta foi melhor durante outono, com IAC médio de  $101,16 \pm 4,97$  e de  $98,46 \pm 4,12$  no verão (TABELA 4). De acordo com Penasa et al. (2016) valores de IAC superiores a 100 são desejáveis, uma vez que indicam valores globais favoráveis das PCL, os autores também relataram que os valores mais favoráveis para o IAC foram obtidos das amostras analisadas durante outono e inverno, com maior valor no mês de março (101,2) e, um leve enfraquecimento na capacidade de coagulação foi observado durante o verão, com valor mais baixo (98,6), referente ao mês de julho, resultado similar ao encontrado nesse estudo.

Com relação às células somáticas (TABELA 4), os valores ficaram entre 3,91 ( $188 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>) e 3,27 ( $121 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>), valores próximos aos relatados por De Marchi et al. (2007); Cassandro et al. (2008) e Toffanin et al. (2015) que encontraram valores de 4,01 ( $211 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>), 3,08 ( $97 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>) e 4,40 ( $266 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>), respectivamente. De acordo com a correlação de Pearson (TABELA 3) houve correlação positiva e significativa com TCE (0,1312) e negativa com o  $A_{30}$  (-0,1193) e com o IAC (-0,1213), porém baixas. Ikonen et al. (2004) relataram que o aumento das células somáticas resultou no aumento do TCE e na diminuição do  $A_{30}$  para leites de animais da raça finlandesa (Finnish Ayrshire), com ECS médio de 4,02 ( $200 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>). Comin et al. (2005) também constataram que aumento das células somáticas resultou em maior tempo para o início da coagulação para leites de animais da raça holandesa, com valor médio de 4,53 ( $288,49 \times 10^3$  CS mL<sup>-1</sup>) para células somáticas. Cecchinato et al. (2011) encontrou que baixos valores de ECS foram correlacionados com maior  $A_{30}$  o que é desejável na elaboração de queijos. A quantidade de células somáticas presentes em leites provenientes de glândulas mamárias saudáveis é inferior a  $1,00 \times 10^5$  CS mL<sup>-1</sup> (BYTYQI et al., 2010). Entretanto, todas as amostras de leite analisadas apresentaram valores dentro do padrão exigido pela Comunidade Europeia, como descrito no

regulamento CE n° 853/2004, que é de no máximo  $4,00 \times 10^5$  CS mL<sup>-1</sup> (CE, 2004), o que contribuiu para baixa interferência nas propriedades de coagulação.

Como foram observadas diferenças em função do período de análise, foi aplicado o Modelo Linear Generalizado (MLG), para verificar a influência desse efeito bem como da origem do leite (propriedades) e a interação entre eles em cada variável dependente. A TABELA 5 apresenta o modelo de efeito para cada variável dependente.

TABELA 5 - COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS NO MODELO LINEAR GENERALIZADO

Efeitos	Gordura		PT*		CN*		Lactose*		ECS*		pH		TCE*		A <sub>30</sub> *		IAC*	
	g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>						min		mm			
	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.
Períodos	6,52	<0,05	1,84	0,17	2,91	0,08	0,02	0,90	4,13	<0,05	0,09	0,76	18,54	<0,05	27,55	<0,05	19,12	<0,05
Propriedades	26,62	<0,05	56,33	<0,05	69,94	<0,05	2,06	0,84	20,89	<0,05	125,02	<0,05	15,86	<0,05	23,38	<0,05	29,41	<0,05
Propriedades x Períodos	21,55	<0,05	6,20	0,28	7,27	0,20	5,18	0,39	1,44	0,91	40,80	<0,05	14,38	<0,05	20,15	<0,05	21,73	<0,05

\*PT (proteína total); CN (caseína); ECS (escore de células somáticas); TCE (tempo de coagulação enzimática); A<sub>30</sub> (firmeza da coalhada); IAC (índice de aptidão de coagulação do leite).

Como pode ser observado na TABELA 5, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os teores de gordura, ECS, TCE, A<sub>30</sub> e IAC, considerando todas as amostras, nos períodos de análise (verão e outono), como já verificado pelo teste t (TABELA 4). Entretanto, considerando as seis propriedades, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre todas variáveis com exceção da lactose (TABELA 5), e o mesmo ocorreu entre os períodos.

A lactose é um dos componentes mais estáveis no leite, porém gordura, proteína total, caseína, ECS e pH, são parâmetros que oscilam mais facilmente em função da nutrição, fatores ambientais e das características genéticas dos animais (DEL PRATO, 2001; GUETOUACHE; GUESSAS; MEDJEKAL, 2014). Mesmo se tratando de vacas da mesma raça e considerando que as propriedades rurais são localizadas na mesma província (Veneza), os animais não dispunham do mesmo manejo e nutrição, o que pode ter contribuído para as diferenças significativas encontradas para alguns parâmetros considerando a propriedade de origem. A interação entre os fatores (período x propriedades) foi significativa ao nível de 5% para algumas variáveis. Isto significa que, alguma propriedade pode mostrar um comportamento diferenciado para o teor de gordura, pH, TCE, A<sub>30</sub> e IAC analisados no período de coleta (verão ou outono) (TABELA 5).

Na TABELA 6 pode-se observar as comparações estabelecidas entre pares para a interação dos efeitos: propriedades x períodos, para cada variável dependente. As propriedades PB, PC e PF, por exemplo, apresentaram valores estatisticamente ( $p < 0,05$ ) diferentes para o TCE, A<sub>30</sub> e IAC, entre as amostras coletadas no verão e outono. O mesmo

não foi observado nas propriedades PA, PD e PE o que sugere que essas propriedades provavelmente possuíam instalações mais adequadas, como sistemas de ventilação e/ou de refrigeração, que contribuíram para minimizar o estresse térmico e os efeitos provocados por ele nas propriedades de coagulação do leite.

TABELA 6 – COMPARAÇÕES ESTABELECIDAS ENTRE PARES PARA INTERAÇÃO: PROPRIEDADES X PERÍODOS PARA CADA VARIÁVEL DEPENDENTE

Propriedades Períodos	Gordura g.100mL <sup>-1</sup>	PT* g.100mL <sup>-1</sup>	CN* g.100mL <sup>-1</sup>	Lactose g.100mL <sup>-1</sup>	ESC*	pH	TCE* min	A <sub>30</sub> * mm	IAC*
PAV	3,45 ± 0,36	3,59 ± 0,22	2,84 ± 0,20	4,89 ± 0,21	3,66 ± 1,38	6,56 ± 0,06	22,84 ± 3,71	14,40 ± 11,27	96,66 ± 3,54
PAO	3,96 ± 0,71	3,40 ± 0,44	2,67 ± 0,34	4,79 ± 0,21	2,97 ± 2,00	6,53 ± 0,06	21,26 ± 4,48	15,91 ± 10,02	95,59 ± 2,43
PBV	4,16 ± 0,77 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,47	2,58 ± 0,37	4,82 ± 0,28	4,05 ± 3,44	6,48 ± 0,06 <sup>b</sup>	21,09 ± 4,83 <sup>a</sup>	14,40 ± 10,14 <sup>b</sup>	97,80 ± 3,90 <sup>b</sup>
PBO	3,71 ± 0,91 <sup>b</sup>	3,57 ± 0,50	2,79 ± 0,39	4,77 ± 0,20	3,69 ± 2,45	6,55 ± 0,06 <sup>a</sup>	17,76 ± 5,08 <sup>b</sup>	26,94 ± 13,48 <sup>a</sup>	101,52 ± 4,61 <sup>a</sup>
PCV	4,29 ± 0,66 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,42	2,68 ± 0,34	4,76 ± 0,17	2,98 ± 1,73	6,66 ± 0,05 <sup>a</sup>	22,44 ± 4,47 <sup>a</sup>	15,00 ± 10,45 <sup>b</sup>	97,26 ± 4,15 <sup>b</sup>
PCO	3,31 ± 0,64 <sup>b</sup>	3,47 ± 0,43	2,70 ± 0,33	4,80 ± 0,17	2,63 ± 1,80	6,61 ± 0,06 <sup>b</sup>	15,88 ± 5,49 <sup>b</sup>	32,80 ± 13,62 <sup>a</sup>	103,41 ± 4,83 <sup>a</sup>
PDV	4,24 ± 0,81	3,30 ± 0,40	2,55 ± 0,33	4,81 ± 0,22	4,58 ± 2,07	6,61 ± 0,06 <sup>a</sup>	20,97 ± 4,18	18,74 ± 10,11	98,40 ± 3,57
PDO	3,97 ± 0,47	3,53 ± 0,32	2,71 ± 0,24	4,81 ± 0,17	4,21 ± 1,75	6,57 ± 0,06 <sup>b</sup>	20,25 ± 4,56	22,03 ± 12,11	99,50 ± 4,19
PEV	3,60 ± 0,92	2,96 ± 0,40	2,24 ± 0,30	4,74 ± 0,26	4,91 ± 2,80	6,60 ± 0,11	17,81 ± 5,18	20,12 ± 11,38	100,32 ± 4,29
PEO	3,29 ± 0,56	3,01 ± 0,30	2,31 ± 0,22	4,83 ± 0,18	3,64 ± 2,17	6,61 ± 0,05	18,18 ± 5,53	19,68 ± 10,51	100,07 ± 4,35
PFV	4,10 ± 0,97	3,52 ± 0,40	2,75 ± 0,32	4,77 ± 0,23	3,28 ± 2,05	6,52 ± 0,08 <sup>b</sup>	20,33 ± 5,15 <sup>a</sup>	20,58 ± 13,03 <sup>b</sup>	99,22 ± 4,91 <sup>b</sup>
PFO	4,16 ± 0,82	3,66 ± 0,44	2,87 ± 0,36	4,80 ± 0,17	2,98 ± 2,34	6,56 ± 0,09 <sup>a</sup>	16,79 ± 4,94 <sup>b</sup>	32,79 ± 14,32 <sup>a</sup>	102,98 ± 4,60 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias com diferentes letras na mesma coluna e considerando a mesma propriedade no verão (V) e outono (O) diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) as demais sem letras não apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ); \* PT (proteína Total); CN (caseína); ECS (escorre de células somáticas); TCE (tempo de coagulação enzimática); A<sub>30</sub> (firmeza da coalhada); IAC (índice de aptidão de coagulação do leite).

## 5.2.2 Análises comparativas entre as amostras de leite coaguladas (AC) e não coaguladas (NC)

O total de amostras não coaguladas (NC) foi elevado, de 41,2%, sendo que 31,9% foram amostras coletadas no verão e 9,2% referente às amostras coletadas no período do outono. Com o intuito de compreender o elevado número amostras NC, as médias (correspondentes ao verão e outono) da composição química, pH e ECS das amostras coaguladas e NC foram comparadas por meio do teste t (TABELA 7).

TABELA 7- COMPARAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH E ECS DAS AMOSTRAS COAGULADAS (AC) E NÃO COAGULADAS (NC) ANALISADAS NO VERÃO E OUTONO.

Variáveis	Verão		Outono	
	AC**	NC**	AC**	NC**
Gordura, g.100mL <sup>-1</sup>	4,08 ± 0,84 <sup>a</sup>	3,62 ± 0,73 <sup>b</sup>	3,72 ± 0,80 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,67 <sup>a</sup>
PT*, g.100mL <sup>-1</sup>	3,38 ± 0,44 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,37 <sup>b</sup>	3,48 ± 0,46 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,41 <sup>a</sup>
CN*, g.100mL <sup>-1</sup>	2,61 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,31 <sup>b</sup>	2,71 ± 0,37 <sup>a</sup>	2,70 ± 0,33 <sup>a</sup>
Lactose, g.100mL <sup>-1</sup>	4,79 ± 0,24 <sup>a</sup>	4,81 ± 0,24 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,21 <sup>b</sup>
pH	6,56 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,58 ± 0,08 <sup>a</sup>	6,57 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,55 ± 0,08 <sup>b</sup>
ECS*	3,91 ± 2,50 <sup>a</sup>	3,62 ± 2,40 <sup>a</sup>	3,27 ± 2,18 <sup>a</sup>	3,60 ± 2,44 <sup>a</sup>
ITU*	73,24 ± 6,74 <sup>b</sup>	76,81 ± 5,53 <sup>a</sup>	57,43 ± 4,99 <sup>a</sup>	58,64 ± 5,85 <sup>a</sup>

\*PT (proteína total), CN (caseína), ECS (escore de células somáticas), ITU (índice de temperatura e umidade). \*\* Número de amostras: 145 (AC) no verão; 204 (AC) no outono; 189 (NC) no verão e 54 (NC) no outono. <sup>a, b</sup> Médias com diferentes letras na mesma linha para o verão e na mesma linha para outono, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste t.

Considerando os fatores analisados, foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a gordura, proteína total, caseína e pH das amostras coaguladas (AC) e não coaguladas (NC), analisadas durante o verão. Durante o outono as diferenças foram significativas apenas para lactose e pH. A lactose não interfere diretamente na coagulação do leite, e os valores de pH mesmo apresentando valores médios com diferença significativa, de ordem prática essa diferença é pequena para interferir na coagulação. Com relação aos demais fatores, a caseína apresenta uma relação direta com a coagulação, mas como pode ser observado (TABELA 7) no verão houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o teor de caseína das amostras AC (2,61 g.100mL<sup>-1</sup>) e NC (2,44 g.100mL<sup>-1</sup>), entretanto no outono não. As médias foram de 2,71 g.100mL<sup>-1</sup> para as amostras AC e 2,70 g.100mL<sup>-1</sup> para as NC. O teor de médio de caseína relatado por diversos autores está entre 2,52 a 2,70 g.100mL<sup>-1</sup> (CASSANDRO et al., 2008; DE MARCHI et al., 2008; CECCHINATTO et al., 2011; TIEZZI et al., 2013; BONFATTI et al., 2014; TOFFANIN et al., 2015; PENASA et al., 2016) e dentre estes, o que apresentou menor teor (2,52 g.100mL<sup>-1</sup>) apresentou 12,9% de amostras NC (TOFFANIN et al., 2015). Entretanto, para os que apresentaram os maiores valores de caseína, 2,65 e 2,70 g.100mL<sup>-1</sup>, a porcentagem de amostras NC foi de 9,7% para Cassandro et al. (2008) e de 3,0% para Penasa et al. (2016). De acordo com a literatura o teor de caseína é um importante fator para as PCL, porém, a associação da caseína com amostras NC está diretamente relacionado com a concentração da  $\kappa$ -CN relativa ao total de caseína presente (HALLÉN et al., 2010; FREDRIKSEN et al., 2011) e não apenas com concentração total de caseína.



A concentração de  $\kappa$ -CN está correlacionada negativamente com o tamanho das micelas de caseína e amostras com micelas de caseínas menores se agregam em um tempo mais curto durante a coagulação (FREDERIKSEN et al., 2011) formando uma coalhada mais firme (GLANTZ et al., 2010) quando comparadas a micelas maiores. Sendo assim, os resultados obtidos nessa pesquisa corroboram com a literatura.

Foram observadas diferenças nas médias em função do período de análise (TABELA 7, teste t) considerando amostras AC e NC para o verão e outono separadamente. Porém, para verificar possíveis diferenças estatísticas considerando além do período, as propriedades e a interação entre propriedades x períodos foi aplicado o Modelo Linear Generalizado (MLG). Na TABELA 8, são apresentados os resultados do MLG aplicado com intuito de verificar a influências dos efeitos (períodos de análise, propriedades e a interação entre eles) nas variáveis dependentes das amostras de leite AC e NC.

TABELA 8- COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS NO MODELO LINEAR GENERALIZADO ENTRE AS AMOSTRAS COAGULADAS E NÃO COAGULADAS

Efeitos	Gordura, g.100mL <sup>-1</sup>		PT*, g.100mL <sup>-1</sup>		CN*, g.100mL <sup>-1</sup>		Lactose*, g.100mL <sup>-1</sup>		ECS*		pH		ITU*	
	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.	Wald ChiSq	Sig.
Períodos	7,08	<0,05	17,70	<0,05	21,50	<0,05	1,77	0,38	1,50	0,22	3,94	0,05	3,49 x 10 <sup>7</sup>	<0,05
Propriedades	75,44	<0,05	97,34	<0,05	112,65	<0,05	11,78	0,18	40,73	<0,05	205,68	<0,05	1,27 x 10 <sup>7</sup>	<0,05
Propriedades x Períodos	29,49	<0,05	25,06	<0,05	29,40	<0,05	27,52	<0,05	9,90	0,54	66,44	<0,05	8,5 x 10 <sup>7</sup>	<0,05

\*PT (proteína total), CN (caseína), ECS (escore de células somáticas), ITU (índice de temperatura e umidade)

De acordo com resultados apresentados na TABELA 8, houve diferença estatística significativa entre os teores de gordura, proteína total e caseína e entre os valores de ITU nos períodos de coleta e análise (verão e outono). Considerando apenas as propriedades, não houve diferença significativa entre as mesmas, apenas para a lactose e, a interação entre propriedades x períodos foi significativa para todas as variáveis com exceção para o ECS, o que significa que alguma(s) propriedade(s) apresentou (apresentaram) valor diferenciado do teor de gordura, proteína total, caseína, lactose, pH e também para o ITU nos períodos de coletas.

Leites NC ou com coagulação lenta são encontrados com frequência, mas sabe-se que esse fenômeno está associado a vários fatores já mencionados tais como pH, mastite, concentração de  $\kappa$ -CN e genótipos, estágio de lactação e a raça (IKONEN et al., 2004; TYRISEVÄ et al., 2004; FREDERIKSEN et al., 2011; TIEZZI et al., 2013). Com resultados obtidos nesse trabalho ficou evidente que no verão, onde o ITU apresentou média acima de 72 (zona limite para o início de estresse térmico), foram encontradas a maior porcentagem de amostras NC, porém a composição química parece não ter influenciado essa resposta. Se

forem considerados, por exemplo, os teores de proteína total e caseína entre amostras AC e NC no verão observa-se que houve diferença significativa entre eles, com menor valor desses índices para amostras NC. Entretanto, considerando os resultados dos leites avaliados no outono, os valores tanto para proteína total e caseína foram praticamente os mesmos entre as amostras AC e NC (TABELA 7). Os dados obtidos nesse trabalho possibilitam afirmar que amostras NC ocorrem mais no verão que no outono, provavelmente devido ao estresse térmico sofrido pelos animais dado as elevadas temperaturas e umidade da estação.

### 5.3 CONCLUSÕES

Os resultados dessa pesquisa demonstraram diferenças significativas entre amostras de leites analisadas durante o verão e outono, independente das propriedades de onde foram coletados os leites. Os melhores resultados das propriedades de coagulação dos leites: tempo de coagulação (TCE),  $A_{30}$  (firmeza do coágulo) e índice de aptidão a coagulação (IAC), foram para as amostras coletadas durante o outono e, conseqüentemente, houve a menor percentagem de leites não coaguláveis nesse período. O verão foi caracterizado por elevados índices de temperatura e umidade (ITU), o que pode ter contribuído para o elevado número de amostras não coaguláveis.

Os teores de proteína total e caseína das amostras de leite coaguladas (AC) e não coaguladas (NC) não foram suficientes para predizer a habilidade do leite à coagulação enzimática.

Considerando a importância tecnológica do leite para produção de queijos e de acordo com os resultados nessa pesquisa o fraco desempenho do leite analisado durante o verão fato este que pode estar associado ao estresse térmico sofrido pelos animais nesse período conclui-se que conhecer e acompanhar as propriedades de coagulação durante todos os períodos do ano são importantes para a produção de queijos.

## **EXPERIMENTO 2: PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA DE LEITE BOVINO *IN NATURA* COLETADOS NA CIDADE DE PONTA GROSSA – PARANÁ, BRASIL.**

### **RESUMO**

Na produção de queijos, a coagulação do leite é uma etapa decisiva, com influência na qualidade e no rendimento. O gel formado pela coagulação enzimática do leite é viscoelástico e suas propriedades reológicas podem ser determinadas por oscilação dinâmica de baixa amplitude. Neste trabalho foram analisadas amostras de leite coletadas individualmente de dezessete animais de duas raças, Holandesa e mestiça (Jersey-Holanda), em três períodos do ano: maio (P1), agosto (P2) e dezembro (P3). O teor de gordura, proteína total, caseína e lactose foram determinados por espectroscopia no infravermelho médio; a contagem de células somáticas por fluorescência ótica e o pH com uso de pHmetro. As propriedades reológicas  $G'$  (módulo de elástico),  $G''$  (módulo de perda) e  $\tan \delta$  (tangente de perda) foram analisadas por reometria em regime oscilatório de baixa amplitude, e também foi determinado o tempo de coagulação enzimática (TCE, min) em função do  $G'$ . A partir de amostras do sangue dos animais, foram determinados os genótipos para kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), beta-caseína ( $\beta$ -CN) e beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) pela técnica de PCR-RFLP. O índice de temperatura e umidade (ITU) também foi calculado nos três períodos de coleta. Foram encontradas diferenças entre a composição dos leites nos diferentes períodos de análise, bem como no perfil reológico. Nas amostras dos leites analisados, os módulos  $G'$  e  $G''$  aumentaram com o tempo de coagulação e foram caracterizados como géis fracos em função do comportamento dos módulos na varredura de frequência (na faixa 0,1 Hz a 10 Hz) aplicada após 45 minutos de coagulação. Entretanto as amostras de leite do animal 14 foram definidas como não coaguláveis (NC), isto é, ambos  $G'$  e  $G''$  não aumentaram com o tempo e o  $G'$  permaneceu  $< 1,0$  Pa no final da análise. Nas amostras coaguladas, os módulos  $G'$  obtidos foram inversamente proporcionais ao TCE, isto é, géis mais fortes tendem a coagular em menor tempo. Durante os períodos de coleta os valores de ITU foram baixos 58,37 no P1; 58,90 no P2 e 66,62 no P3 e não apresentaram influência nas propriedades reológicas. Foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os teores de gordura, lactose, pH e para o escore de células somáticas (ECS) entre os períodos de análise e, entre as raças, apenas houve diferença entre a proteína total e caseína, porém, não houve diferença significativa para gordura. Com relação ao perfil proteico foram encontrados os alelos AA; AB e BB para  $\kappa$ -CN; A1A2 e A2A2 para  $\beta$ -CN e AA; AB e BB para  $\beta$ -Lg, porém não foi observada uma relação direta com as propriedades de coagulação e com o TCE. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as características reológicas foram fundamentais para avaliar o destino apropriado ao leite. As amostras de leite de 15 animais analisados foram consideradas adequadas para produção de queijos, entretanto, as amostras de dois animais mestiços, um com TCE  $> 36$  min (animal 13) e o outro não coagulável (animal 14) foram considerados inadequados para produção de queijos via coagulação enzimática.

**Palavras-chaves:** Propriedades de coagulação do leite. Ensaio reológico. Queijos.

# **RHEOLOGICAL PROPERTIES OF THE RENNET COAGULATION OF *IN NATURA* COW'S MILK COLLECTED IN THE CITY OF PONTA GROSSA – PARANÁ, BRAZIL.**

## **ABSTRACT**

Milk coagulation is a decisive step in cheese production, influencing both quality and yield. The gel formed by the rennet coagulation of milk is viscoelastic and its rheological properties can be determined by low amplitude dynamic oscillation. Milk samples collected individually from seventeen animals from two breeds, Holstein and mixed Holstein-Jersey, were analyzed in this study in three periods during the year: May (P1), August (P2) and December (P3). The fat, total protein, casein and lactose contents were determined by medium infrared spectroscopy; the somatic cell count by optical fluorescence; and the pH using a pH-meter. The rheological properties  $G'$  (storage modulus),  $G''$  (loss modulus) and  $\tan \delta$  (loss tangent) were analyzed by rheometry in a low amplitude oscillatory regime, and the milk rennet coagulation time (TCE, min) determined as a function of  $G'$ . The genotypes for kappa-casein ( $\kappa$ -CN), beta-casein ( $\beta$ -CN) and beta-lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) were determined from the animals' blood samples using the PCR-RFLP technique. The temperature-humidity index (THI) was also calculated for the three collection periods. Differences were found between the compositions of the milks from the three periods analyzed, and also in their rheological profiles. In the milk samples analyzed, the moduli  $G'$  and  $G''$  increased with coagulation time and were characterized as weak gels based on the behavior of the moduli in the frequency scan (from 0.1 Hz to 10 Hz) applied after 45 minutes of coagulation. However the milk samples from animal n° 14 were defined as non-coagulating (NC), that is, neither  $G'$  or  $G''$  increased with time and  $G'$  was still  $< 1.0$  Pa at the end of the analysis. For the coagulated samples, the moduli  $G'$  obtained were inversely proportional to the RCT, that is, the milks giving stronger gels tender to coagulate quicker. During the collection periods, the values for THI were below 58.37 for P1, 58.90 for P2 and 66.62 for P3, and did not influence the rheological properties. Significant differences ( $p < 0.05$ ) between the fat and lactose contents and between the pH and SCS (somatic cell score) values were found between the analysis periods, and differences in the total protein and casein contents found between the breeds, with no differences in the fat contents. With respect to the protein profile, the alleles AA; AB and BB for  $\kappa$ -CN; A1A2 and A2A2 for  $\beta$ -CN and AA; AB and BB for  $\beta$ -Lg were found, but no direct relationship was observed between the coagulation properties and RCT. The results obtained in this study demonstrated that the rheological characteristics were fundamental to evaluate the appropriate destiny for a batch of milk. The milk samples from 15 of the animals analyzed were considered adequate for cheese production, but the samples from two of the mixed Holstein-Jersey breed animals, one with a RCT value  $> 36$  min (animal 13) and the other non-coagulating (animal 14) were considered inadequate for cheese production by rennet coagulation.

**Keywords:** Milk coagulation properties. Rheological assays. Cheeses.

## 6 INTRODUÇÃO

A coagulação enzimática do leite pode ser dividida em duas fases, sendo a principal referente à ação enzimática onde ocorre a clivagem da  $\kappa$ -CN, entre os resíduos 105-106 (fenilalanina-metionina), promovendo a liberação de caseinomacropeptídeo (CMP:  $\kappa$ -CN, cadeia polipeptídica 106-169) para o soro, que é a parte altamente hidrofílica C-terminal da  $\kappa$ -CN. Assim, as micelas de caseínas são desestabilizadas em função da diminuição da repulsão estérica fornecida pelo CMP, que é carregado negativamente (HYSLOP, 2003). A segunda fase, não enzimática, é iniciada quando cerca de 70% das  $\kappa$ -CN estão hidrolisadas. As micelas desestabilizadas dão início a segunda fase, a de agregação espontânea, resultando num gel semelhante a uma rede, denominado de coalhada, o qual contém a parte N-terminal da  $\kappa$ -CN (para- $\kappa$ -CN, peptídeo  $\kappa$ -CN 1-105) (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006; FREDERIKSEN et al., 2011).

Na produção de queijos a coagulação do leite é decisiva, com influência na qualidade e no rendimento, sendo assim é importante determinar a ocorrência e as razões subjacentes para leites que apresentam fraca coagulação ou não coagulam (NC) (FREDERIKSEN et al., 2011). Leites que apresentam alguma dessas características têm sido estudados ao longo dos anos e os resultados indicaram que fatores genéticos (composição proteica) têm papel fundamental (WEDHOLM et al., 2006; JOUDU et al., 2007; JENSEN et al., 2012). Os alelos da  $\kappa$ -CN A e E estão associados com problemas na coagulação em contraste com os alelos B da  $\kappa$ -CN e da  $\beta$ -CN, porém foi verificado que leites provenientes de animais na metade ou no final da lactação, bem como de vacas com mastite, apresentam problemas na coagulação (OKIGBO et al., 1985; IKONEN et al., 2004).

As propriedades viscoelásticas dos alimentos podem ser determinadas em regime oscilatório de baixa amplitude, para determinar a elasticidade, ou seja, o módulo de elástico ( $G'$ ) e a viscosidade ou módulo de perda ( $G''$ ) bem como a tangente de perda ( $\tan \delta$ ), que é a razão entre os módulos  $G''/G'$  (STEFFE, 1996). O gel de leite, formado pela coagulação enzimática, é viscoelástico e suas propriedades reológicas em pequena deformação podem ser determinadas por oscilação dinâmica de baixa amplitude, com a determinação do  $G'$  e  $G''$  (LUCEY et al., 1998). Portanto uma maneira direta de medir a formação de gel é monitorar a evolução das propriedades reológicas durante a coagulação.

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades reológicas ( $G'$  e  $G''$ ) em função do tempo e na varredura de frequência, da coagulação enzimática do leite bovino *in natura*,

coletados em três períodos (maio, agosto e dezembro) e analisar o perfil genético dos animais com relação à  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -caseína e  $\beta$ -lactoglobulina e sua possível relação com a coagulação dos leites.

## 6.1 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1.1 Material

As amostras de leite foram coletadas de vacas que pertencem ao rebanho leiteiro da Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa, localizadas na cidade de Ponta Grossa no Paraná. Foram coletadas individualmente amostras de leite de 17 animais, sendo 14 animais da raça Holandesa (H) e 03 mestiços: Jersey x Holanda (Jersolanda, JH). O leite foi coletado em três períodos distintos durante o ano de 2016. A primeira coleta foi realizada no mês de maio, sendo considerado como período 1 (P1); a segunda em agosto referente ao período 2 (P2) e a terceira em dezembro como período 3 (P3). Para os animais 1, 3, 11 e 17 a coleta foi realizada em apenas dois períodos, pois se encontravam em período de pré-parto nos dias da coleta.

As amostras de leite foram coletadas em frascos específicos, disponibilizados pelo Laboratório Centralizado de Análise de Leite, da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Foram utilizados frascos para coleta de amostra para componentes e contagem de células somáticas (CCS), com o conservante na forma de comprimido de bronopol (2-bromo-2nitropropano-1,3-diol). Após a ordenha de cada animal, as amostras coletadas no frasco medidor foram colocadas diretamente no frasco de coleta. As amostras foram homogeneizadas permitindo a entrada de ar no medidor por no mínimo 10 segundos e após a coleta o leite foi transferido para o frasco e novamente homogeneizado, invertendo os frascos várias vezes, até a dissolução completa das pastilhas de conservante de acordo com procedimento de coleta recomendado pelo Manual de Gestão de Controle de Qualidade e Coleta e Envio de Amostras do APCBRH. Os frascos contendo as amostras foram acondicionados em caixas de poliestireno expandido, com gelo reciclável, para manter em temperatura próxima a 7°C. De cada animal foram coletados dois frascos (com volume aproximado de 50 mL), sendo um deles encaminhado ao Laboratório Centralizado de Análise de Leite da APCBRH para realização de análises de componentes (gordura, proteína, caseína

e lactose) e para análise de CCS e outro para laboratório de Reologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para os ensaios reológicos e determinação do pH.

#### 6.1.2 Métodos

##### 6.1.2.1 Determinação da gordura, proteína total, caseína e contagem de células somáticas

Os teores de gordura, proteína total, caseína e lactose foram determinados eletronicamente por absorção no infravermelho médio, no equipamento Bentley 2000 da Bentley Instruments-USA, (IDF, 2000). A contagem de células somáticas (CCS) no leite foi executada no equipamento Somacount 300 da Bentley Instruments-USA (IDF, 2006) que é um contador eletrônico de células por fluorescência. A contagem de células é feita pelo método conhecido como citometria de fluxo. Para contagem das células o instrumento requer o uso do corante específico brometo de etídio que cora o DNA das células brancas do leite. Um pequeno montante de líquido carreador conduz as células coradas através de uma câmara denominada “flow cell”. Devido a ação do corante fluorescente, cada célula que passa através do feixe de luz, produz um pequeno rompimento. A luz passa através de uma série de filtros ópticos e lentes em um determinado comprimento de onda. O rompimento de luz é transformado em pulso elétrico que são amplificados e filtrados eletronicamente. O computador conta os pulsos elétricos que representa as células brancas do leite (leucócitos) e as células de descamação do úbere do animal. Para as análises descritas às amostras eram previamente aquecidas a 40°C durante 15 minutos (em banho termostatzado) e na sequência levadas aos respectivos equipamentos para a análise (IDF, 2006).

Os valores de células somáticas foram transformados, em uma escala logarítmica (Equação 5), para escore de células somáticas (ECS), a fim de alcançar a normalidade e homogeneidade das variâncias.

As informações sobre os dias de lactação (DL) e número de partos (NP) foram obtidos com o responsável pelo rebanho da Fazenda Escola Capão da Onça.



#### 6.1.2.2 Determinação do pH

A determinação do pH das amostras foi realizada utilizando pHmetro de bancada QUIMIS®.

#### 6.1.2.3 Análise do polimorfismo genético da $\kappa$ -caseína, $\beta$ -caseína e $\beta$ -lactoglobulina

O DNA dos animais foi obtido a partir de amostras de sangue coletadas de cada animal. Foram coletados 10 mL de sangue, por via endovenosa, de cada animal, na sequência o sangue foi transferido e acondicionado em tubos *vacutainer* de 5 mL, contendo ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante, e homogeneizados de forma lenta por alguns segundos. Após a coleta as amostras foram mantidas sob refrigeração (6 a 7 °C) até a realização das análises. Para extração do DNA foram utilizadas duas soluções-tampão, sendo a primeira o tampão de lise (sacarose, MgCl, Tris-HCl e triton X-100), que atua rompendo membranas e liberando todo o conteúdo da célula. A segunda é o tampão de extração (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS e Rnase A), que degrada a membrana nuclear expondo o DNA, além de promover a degradação do RNA. A primeira fase da extração de DNA iniciou-se com sucessivas lavagens com tampão de lise até a obtenção de um precipitado branco (leucócitos); este precipitado foi então resuspendido com 800  $\mu$ L de tampão de extração e 16  $\mu$ L de dithiothreitol (DTT) 10% (antioxidante). As amostras foram então mantidas em banho-maria a 37°C por 2 horas, para a ação da enzima RNase. Após esse tempo, foram adicionados 30  $\mu$ L de Proteinase K (10 mg/mL), para degradação de resíduos celulares e proteínas, ficando as amostras mantidas a 50 °C (por 12 horas). Em seguida, iniciou-se a segunda fase do processo de extração, que consistiu no tratamento das amostras com fenol e clorofórmio para separar resíduos celulares e proteínas do DNA. Foram adicionados 300  $\mu$ L de fenol e 300  $\mu$ L de clorofórmio na primeira etapa, seguida de 1 minuto de homogeneização em aparelho homogeneizador de tubos, tipo Vortex e, após, cinco minutos de centrifugação. A fase aquosa, superior, foi retirada e transferida para um novo tubo. Esta etapa foi repetida mais duas vezes, usando 600  $\mu$ L de clorofórmio, para retirar o fenol e promover a desproteínização. Em seguida, foram adicionados 80  $\mu$ L de acetato de sódio 3 M, para neutralizar parcialmente a carga negativa do DNA e, 600  $\mu$ L de isopropanol gelado, para provocar a desidratação do DNA (promovendo a precipitação do mesmo). Após essa etapa, as amostras foram acondicionadas a uma temperatura de -20 °C por no mínimo de

duas horas, finalizando a segunda fase da extração. Na terceira fase da extração, centrifugaram-se as amostras para a obtenção de um *pellet*, que foi hidratado com 400 µL de etanol 70% gelado (-20 °C) e novamente as amostras foram centrifugadas, desprezando o sobrenadante. Os pellets foram colocados para secar por aproximadamente 30 minutos e foram resuspendidos em 500 µL de TE (Tris-HCL e EDTA). Ao final desta etapa, as amostras de DNA foram armazenadas sob refrigeração (6 a 7 °C) até iniciar processo de genotipagem. A identificação dos alelos para os genes da kappa-caseína (κ-CN) e beta-caseína (β-CN) foram realizadas de acordo com Barroso, Dunner e Cañon (1998) e, da beta-lactoglobulina (β-Lg), de acordo com Buchberger (1995). A metodologia usada para a identificação dos alelos foi a de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição), que consiste em amplificar o gene de interesse e utilizar uma enzima de restrição que irá identificar diferentes SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*) e clivar o fragmento amplificado de forma específica. A visualização e determinação dos tamanhos dos fragmentos foram realizadas em gel de poliacrilamida nativa 8% corado com nitrato de prata. Para a determinação dos alelos do gene responsável pela expressão da β-lactoglobulina, o DNA foi amplificado utilizando os *primers*:

- *forward*: 5'-TGTGCTGGACAGCGACTACAAAAAG-3' e,

- *reverse*: 5'-GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT- 3' que foram digeridos com a enzima de restrição *HaeIII*.

Para a genotipagem da κ-caseína foram utilizados os primers:

-CASK-F: 5'-TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG - 3' e,

-CASK-R: 5'-GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG-3'. A digestão enzimática foi realizada com a enzima *HinfI*.

E para genotipagem para β-caseína foram utilizados os primers:

-CASB-F: 5'-GCAGAATTCTAGTCTATCCCTTCCCTGGACCCATGC-3' e,

-CASB-R: 5'-ACGGACTGAGGAGGAAACATGACAGTTGGAGGAAG-33

(OLENSKI et al., 2010). A digestão enzimática foi realizada com a enzima *MphI*103I. A partir da imagem dos géis foram realizadas as interpretações dos resultados. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora-Minas Gerais.

#### 6.1.2.4 Ensaios reológicos

Os ensaios reológicos foram conduzidos em um reômetro Haake Mars II (Thermo Electron GmbH, Alemanha) acoplado a um banho termostaticado Haake K15, termocirculador de água DC5B3 Haake e a um controlador de temperatura Peltier (TC 81, Haake). O sensor utilizado foi do tipo cone-placa com diâmetro de 60,0 mm e ângulo do cone de 2,0° (C60 2,0°/TiL). O experimento foi realizado de acordo com metodologia descrita por Esteves, Lucey, Pires et al. (2002), porém, com volume de leite igual a 3,0 mL e de acordo com estudos de Hussain, Grandison e Bell (2011). Antes de iniciar os experimentos, cada amostra de leite (*in natura*) individual foi aquecida a 35 °C (temperatura do ensaio) e adicionou-se então 100,0 µL do coagulante líquido, composto por 20,0% de quimosina e 80,0% de pepsina com 320 IMCU/mL, de origem bovina, previamente diluído em água destilada a fim de obter concentração final de 0,053 IMCU/mL de leite, a 3,0 mL de leite, que foi misturado completamente por 30 segundos e a mistura foi imediatamente transferida para a placa do reômetro. Para cada amostra individual foram realizadas varreduras de tempo, com 40 medidas do módulo elástico ( $G'$ ) e do módulo de perda ( $G''$ ) durante 45 minutos a uma frequência fixa de 0,1 Hz e deformação constante de 1,0% a 35 °C. Decorridos os 45 minutos, foi realizada uma varredura de frequência em modo de controle de deformação, a 35 °C, na faixa 0,1 Hz a 10 Hz, a uma deformação constante de 1,0%, a fim de avaliar o comportamento viscoelástico da coalhada formada após coagulação enzimática. Com estas informações, foi possível caracterizar a firmeza da coalhada. O tempo para o início da coagulação enzimática (TCE) em minutos foi definido quando o módulo de armazenamento  $G'$  apresentou valor  $\geq 1,0$  Pa na varredura de tempo (LUCEY et al., 2000). Os experimentos foram realizados em duplicata.

#### 6.1.2.5 Índice de temperatura e umidade (ITU)

Os índices de temperatura e umidade foram calculados de acordo com a equação 7, da *National Research Council* (NRC, 1971):

$$ITU = (1,8 \times T + 32) - (0,55 - 0,0055 \times RH) \times (1,8 \times T - 26) \quad (7)$$

Sendo: T - temperatura (°C) e RH – umidade relativa (%).

Os dados da temperatura e umidade relativa foram fornecidos pelo Sistema Meteorológico do Paraná – SIMEPAR. Para o cálculo foram utilizados os valores médios de temperatura e umidade.

### 6.1.3 Análises estatísticas

O conjunto de dados foi submetido à análise de estimação de equações generalizadas (GEE). As variáveis dependentes que apresentaram distribuição normal foram analisadas utilizando-se função de ligação identidade. As análises de GEE foram realizadas no Software SPSS versão 22. A análise de cluster (*two way joining*) das variáveis dependentes: proteína total, caseína e TCE e a análise de correlação, utilizando-se o coeficiente de Pearson, foram realizadas no software STATISTICA 8.0.

## 6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.2.1 Composição química, pH, escore de células somáticas e índice de temperatura e umidade

Na TABELA 9 pode-se verificar os resultados da composição química (gordura, proteína total e caseína), pH, escore de células somáticas (ECS), os índices zootécnicos: número de partos (NP) e dias de lactação (DL) de cada animal e o índice de temperatura e umidade (ITU) nos três períodos de análise. Os resultados são referentes aos leites coletados nos períodos P1 (maio), P2 (agosto) e P3 (dezembro), porém para os animais 1, 3, 11 e 14 não foi possível realizar três coletas, devido ao período seco, que é uma necessidade fisiológica do animal com relação direta com a saúde da glândula mamária e a produção de leite, esse período antecede o parto (FONSECA, SANTOS, 2000).

Com relação ao teor de gordura, proteína total, caseína, lactose e pH os valores encontrados estão próximos ao relatado na literatura (CASSANDRO et al., 2008; LAW, TAMIME, 2010; FREDERIKSEN et al., 2011, TIEZZI et al., 2015). Porém, variações na composição química do leite, considerando uma mesma raça ou raças diferentes, são bastante comuns, em função de fatores como nutrição, genética e condições ambientais, que são diferentes entre os rebanhos. Devido às variações que podem ocorrer, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu por meio de Instruções Normativas (IN) valores mínimos para a composição química do leite, para parâmetros microbiológicos, físicos, químicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos. Dos resultados encontrados algumas amostras apresentaram valor de gordura e proteína total abaixo do valor mínimo recomendado pela normativa que é de 3,0% e 2,9%, respectivamente de acordo com a IN-62 (BRASIL, 2011; BRASIL, 2016). A gordura é um dos componentes do leite mais abundante e variável, seguido pela proteína. As variações de concentrações são decorrentes principalmente da genética, da alimentação dos animais e de variações sazonais (DEL PRATO, 2001; GODDARD, 2001).

TABELA 9- COMPOSIÇÃO QUÍMICA, pH, ESCORE DE CÉLULA SOMÁTICAS (ECS), NÚMERO DE PARTOS (NP), DIAS DE LACTAÇÃO (DL) E ÍNDICE DE TEMPERATURA DE UMIDADE (ITU) DOS LEITES NOS PERÍODOS: P1, P2 E P3

Animal	Raça**	Período**	Característica analisadas				Índices Zootécnicos				
			Gordura g.100mL <sup>-1</sup>	PT*** g.100mL <sup>-1</sup>	CN*** g.100mL <sup>-1</sup>	Lactose g.100mL <sup>-1</sup>	ECS	pH	NP	DL, dias	ITU
1*	H	P1	4,09	3,63	2,90	4,41	2,14	7,09	3	160	58,37
		P2	3,71	3,73	2,99	4,25	5,49	7,07	3	230	58,90
2	H	P1	4,43	2,98	2,29	4,95	0,44	7,01	5	33	58,37
		P2	3,87	3,48	2,74	4,97	0,06	6,99	5	109	58,90
		P3	3,93	3,52	2,76	4,68	4,70	6,75	5	221	66,62
3*	H	P1	4,79	3,95	3,17	4,28	3,44	6,93	3	452	58,37
		P3	3,40	2,71	2,15	4,52	5,69	6,95	4	96	66,62
4	H	P1	3,88	3,56	2,84	4,97	0,26	6,90	1	111	58,37
		P2	4,22	3,55	2,82	4,74	1,21	7,14	1	174	58,90
		P3	4,14	3,83	3,02	4,58	1,71	6,87	1	301	66,62
5	H	P1	3,85	2,41	1,80	4,66	3,28	7,04	1	18	58,37
		P2	3,48	2,56	1,93	4,44	3,46	7,12	1	86	58,90
		P3	3,25	3,24	2,51	4,61	2,36	6,78	1	213	66,62
6	H	P1	2,12	3,24	2,59	4,59	1,88	6,95	4	172	58,37
		P2	1,44	3,22	2,56	4,52	2,58	7,08	4	235	58,90
		P3	2,95	3,29	2,58	4,38	3,81	6,86	4	354	66,62
7	H	P1	3,54	3,27	2,60	4,47	2,53	7,02	3	308	58,37
		P2	2,10	3,16	2,48	4,60	3,73	6,93	3	369	58,90
		P3	3,42	2,68	2,02	4,49	0,44	6,77	4	121	66,62
8	H	P1	6,50	2,58	1,90	4,19	3,58	7,00	1	75	58,37
		P2	2,63	3,03	2,37	4,64	1,11	6,95	1	151	58,90
		P3	3,32	3,30	2,60	4,66	3,07	6,81	1	272	66,62
9	H	P1	3,05	2,58	1,98	4,79	4,28	6,94	1	37	58,37
		P2	4,09	2,68	2,02	4,54	4,19	7,06	1	107	58,90
		P3	3,00	3,11	2,46	4,52	3,78	6,86	1	234	66,62
10	H	P1	2,65	2,65	2,06	4,63	-1,32	7,08	3	51	58,37
		P2	2,87	2,98	2,36	4,70	-1,64	6,99	3	128	58,90
		P3	2,95	3,05	2,37	4,58	-0,06	6,82	3	240	66,62
11*	H	P2	3,40	2,71	2,09	4,78	-2,06	6,93	4	36	58,90
		P3	3,06	2,86	2,20	4,71	0,26	6,73	4	148	66,62
12	H	P1	1,37	2,84	2,24	4,81	-0,47	6,94	3	69	58,37
		P2	1,54	3,02	2,38	4,74	1,26	7,05	3	132	58,90
		P3	2,34	3,15	2,46	4,68	2,14	6,80	3	251	66,62
13	H	P1	3,76	3,26	2,59	3,61	6,57	7,02	4	199	58,37
		P2	2,26	3,51	2,83	3,78	5,81	7,16	4	269	58,90
		P3	2,92	3,32	2,64	3,70	4,93	6,95	4	389	66,62
14*	H	P1	2,79	3,37	2,68	4,01	5,04	7,12	6	256	58,37
		P2	2,79	3,44	2,74	3,83	5,12	7,34	6	319	58,90
15	JH	P1	3,78	3,76	3,04	4,03	4,85	6,90	3	309	58,37
		P2	3,37	4,10	3,35	4,35	5,28	7,18	3	372	58,90
		P3	3,66	3,05	2,43	4,18	7,58	6,83	4	34	66,62
16	JH	P1	2,24	3,14	2,49	4,71	0,68	7,06	5	42	58,37
		P2	3,02	3,28	2,61	4,71	-1,64	6,98	5	111	58,90
		P3	4,68	3,21	2,48	4,36	0,82	6,85	5	223	66,62
17	JH	P1	2,72	4,23	3,42	4,59	7,27	6,91	3	6	58,37
		P2	2,58	3,08	2,42	4,77	4,69	7,13	3	75	58,90
		P3	3,32	2,99	2,31	4,73	5,77	6,86	3	194	66,62

\* Animais avaliados em dois períodos.\*\* H (Holandesa), JH (Jersolanda); P1 (Maio), P2 (Agosto) e P3 (Dezembro); \*\*\*PT (proteína total), CN (caseína).

De acordo com dados obtidos a partir das equações de estimação generalizadas (GEE) (TABELA 10) foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para algumas variáveis entre os períodos, entre as raças e na interação entre período x raça. Considerando os períodos (P1, P2 e P3), foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os teores de gordura, lactose, ECS e pH (TABELA 10).

TABELA 10 - COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS DEPENDENTES EM FUNÇÃO DOS EFEITOS OBTIDOS PELAS EQUAÇÕES DE ESTIMAÇÃO GENERALIZADAS.

Efeitos	Gordura		PT*		CN*		Lactose		ECS*		pH		TCE*	
	g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>		g.100mL <sup>-1</sup>						min	
	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.	Wald	Sig.
	ChiSq		ChiSq		ChiSq		ChiSq		ChiSq		ChiSq		ChiSq	
Períodos	15,11	<0,05	3,07	0,21	4,41	0,11	17,99	<0,05	16,05	<0,05	219,36	<0,05	4,40	0,11
Raças	0,00	0,97	4,58	<0,05	4,40	<0,05	0,00	0,96	0,64	0,43	0,00	0,95	0,50	0,48
Período x Raça	3,88	0,14	5,59	0,06	6,84	<0,05	11,66	0,05	8,40	<0,05	1,45	0,48	7,03	0,05

\*PT (proteína total), CN (caseína), ECS (escore de células somáticas), TCE (tempo de coagulação enzimática)

A gordura foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre os períodos P2 e P3 (TABELA 11), com menor média (2,99) no P2. Os teores de lactose e o pH foram mais altos no P2 com relação ao P3 ( $p < 0,05$ ). Com relação ao escore de células somáticas as diferenças ( $p < 0,05$ ) foram entre os períodos P2 (2,62) e P3 (3,88) (TABELA 11). Variações na composição química do leite podem ocorrer em diferentes períodos do ano e são consideradas normais, devido a modificações na dieta, período de lactação, saúde do animal e estação do ano (FONSECA E SANTOS, 2000).

TABELA 11 - COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ANALISADAS ENTRE OS PERÍODOS (P1, P2 E P3) E AS RAÇAS.

	Variáveis						
	Gordura g.100mL <sup>-1</sup>	PT* g.100mL <sup>-1</sup>	CN* g.100mL <sup>-1</sup>	Lactose g.100mL <sup>-1</sup>	ECS*	pH	TCE* min
Períodos**							
P1	3,26 <sup>a,b</sup>	3,40 <sup>a</sup>	2,70 <sup>a</sup>	4,48 <sup>a,b</sup>	3,23 <sup>a,b</sup>	6,98 <sup>a</sup>	14,10 <sup>a</sup>
P2	2,99 <sup>b</sup>	3,33 <sup>a</sup>	2,64 <sup>a</sup>	4,55 <sup>a</sup>	2,62 <sup>b</sup>	7,08 <sup>a</sup>	17,57 <sup>a</sup>
P3	3,55 <sup>a</sup>	3,15 <sup>a</sup>	2,46 <sup>a</sup>	4,44 <sup>b</sup>	3,88 <sup>a</sup>	6,84 <sup>b</sup>	17,01 <sup>a</sup>
Raças***							
H	3,27 <sup>a</sup>	3,15 <sup>b</sup>	2,47 <sup>b</sup>	4,48 <sup>a</sup>	2,56 <sup>a</sup>	6,97 <sup>a</sup>	17,25 <sup>a</sup>
JH	3,26 <sup>a</sup>	3,43 <sup>a</sup>	2,73 <sup>a</sup>	4,49 <sup>a</sup>	3,92 <sup>a</sup>	6,97 <sup>a</sup>	15,21 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Médias com diferentes letras na mesma coluna, considerando separadamente os períodos das raças, diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de acordo com as médias marginais estimadas por GEE. \*PT (proteína total), CN (caseína), ECS (escore de células somáticas) e TCE (tempo de coagulação enzimática). \*\* P1 (maio), P2 (agosto) e P3 (dezembro). \*\*\* H (Holandesa) e JH (Jersolanda).

Na TABELA 11, observa-se que entre as raças as diferenças encontradas ( $p < 0,05$ ) foram entre a proteína total e caseína, porém, não foi observada diferença significativa para gordura como esperado. Os animais mestiços (JH) apresentaram maior teor de proteína total e

caseína. Uma das características das vacas Jersey é a produção de leite com alta concentração de sólidos totais e, o mesmo acontece com vacas mestiças (FREYER et al., 2008). Segundo, Heins et al. (2008) e Prendiville, Pierce e Buckley (2009) os teores de gordura e proteína total foram maiores nas vacas mestiças (Jersolanda) quando comparadas as holandesas puras.

Na análise de interação entre os dois efeitos (períodos x raças) houve significância ao nível de 5% (TABELA 10) para a caseína e para escore de células somáticas (ECS) demonstrando que para esses parâmetros houve um comportamento diferenciado de pelo menos uma raça com relação aos períodos. Considerando o P1, o teor de caseína nas amostras de leite das vacas mestiças apresentaram teor médio significativamente diferente das amostras de leite das vacas holandesas, 2,98% e 2,42% respectivamente. Entretanto com relação ao escore de células somáticas no período P3 os animais mestiços (JH) apresentaram média significativamente maior com relação ao P2 (4,72 e 2,77, respectivamente). Para as células somáticas, o valor de referência de acordo com a Instrução Normativa, IN-7 (BRASIL, 2016), deve ser no máximo  $5,0 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  o que corresponde ao valor em ECS igual a 5,32. Como pode ser observado (TABELA 9), sete amostras apresentaram valor superior a 5,32 (acima do recomendado pela legislação), quatro amostras de leites de vacas holandesas e três mestiças. De acordo com a literatura, com relação à resistência a mastite, os mecanismos de defesa são semelhantes para as duas raças discutidas (BANNERMAN et al., 2008). Em estudo realizado por Prendiville, Pierce e Buckley (2010) com vacas Holandesas, Jersey e mestiças (Jersolanda), não foram encontradas diferenças estatísticas quanto a contagem de células somáticas entre os leites das diferentes raças.

O número de partos (NP) e os dias de lactação (DL) também podem influenciar a composição química do leite (BOBE et al., 1998, IKONEN et al., 2004). Durante as coletas os animais se encontravam entre o primeiro e sexto número de partos (TABELA 9). Os DL foram positivamente correlacionados com o teor de proteína total e caseína (0,5455; 0,5381,  $p < 0,05$ , TABELA 12) e negativamente correlacionados com a lactose (-0,4543,  $p < 0,05$ , TABELA 12). Já o NP não apresentou correlação significativa com as variáveis respostas.

Com relação ao ITU, os valores foram baixos, 58,37; 58,90 e 66,62 referentes aos períodos 1, 2 e 3 respectivamente, valores estes abaixo de 72, que caracteriza um ambiente livre de estresse térmico (ARMSTRONG, 1994) e, até mesmo inferior a 68, que de acordo com Bernabucci et al. (2010) foi relacionado a perdas na produção de leite. O ITU apresentou somente correlação negativa com pH (-0,7478,  $p < 0,05$ , TABELA 12). Mesmo com ambiente livre de estresse térmico no P3 onde o ITU apresentou maior valor (66,62), os valores de pH



encontrados foram inferiores aos valores do P1 e P2 (TABELA 9). O pH é mais facilmente alterado em ambientes mais quentes, devido a fermentação da lactose com produção de ácido láctico (DEL PRATO, 2001), o que pode ter contribuído para esse resultado.

TABELA 12 – CORRELAÇÃO DE PEARSON (r) E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R<sup>2</sup>) ENTRE TCE, PROPRIEDADES REOLÓGICAS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS (ECS), pH, ÍNDICE DE TEMPERATURA E UMIDADE (ITU), DIAS DE LACTAÇÃO (DL) E NÚMERO DE PARTOS (NP).

Variáveis	TCE*	Tan δ	G'	G''	Gordura	PT*	CN*	Lactose	ECS	pH	ITU	DL	NP
TCE, min	<b>1,0000</b>	0,4848	0,2718	0,2521	0,1322	0,0084	0,0037	0,2793	0,1446	0,1258	0,0071	0,0145	0,0026
Tan δ	0,6963*	<b>1,0000</b>	0,1213	0,0825	0,0332	0,0043	0,0024	0,2576	0,1122	0,0187	0,0491	0,0879	0,0010
G', Pa	-0,5213*	-0,3483*	<b>1,0000</b>	0,9938	0,1137	0,1245	0,1084	0,0134	0,0406	0,1246	0,0065	0,0617	0,0435
G'', Pa	-0,5021*	-0,2872*	0,9969*	<b>1,0000</b>	0,1120	0,1233	0,1075	0,0088	0,0331	0,1224	0,0101	0,0720	0,0397
Gordura, g.100mL <sup>-1</sup>	-0,3636*	-0,1823	0,3371*	0,3346*	<b>1,0000</b>	0,0062	0,0008	0,0220	0,0005	0,0147	0,0060	0,0008	0,0204
PT, g.100mL <sup>-1</sup>	-0,0917	-0,0656	0,3528*	0,3512*	0,0785	<b>1,0000</b>	0,9933	0,0505	0,0613	0,0004	0,0008	0,2976	0,0173
CN, g.100mL <sup>-1</sup>	-0,0609	-0,0491	0,3292*	0,3279*	0,0288	0,9966*	<b>1,0000</b>	0,0568	0,0676	0,0024	0,0027	0,2895	0,0214
Lactose, g.100mL <sup>-1</sup>	-0,5285*	-0,5075*	0,1159	0,0939	-0,1483	-0,2247	-0,2382	<b>1,0000</b>	0,3288	0,0160	0,0083	0,2064	0,0079
ECS	0,3803*	0,3349*	-0,2014	-0,1818	0,0219	0,2475	0,2599	-0,5734*	<b>1,0000</b>	0,0146	0,0116	0,0444	0,0230
pH	0,3546*	0,1367	-0,3530*	-0,3498*	-0,1214	0,0188	0,0491	-0,1264	0,1207	<b>1,0000</b>	0,5593	0,0247	0,0084
ITU	-0,0842	0,2215	0,0806	0,1006	0,0776	-0,0281	-0,0516	-0,0911	0,1076	-0,7478*	<b>1,0000</b>	0,0971	0,0061
DL, dias	0,1205	0,2964*	0,2484	0,2684	0,0281	0,5455*	0,5381*	-0,4543*	0,2106	-0,1573	0,3115	<b>1,0000</b>	0,0003
NP	0,0506	-0,0311	0,2085	0,1992	-0,1427	0,1316	0,1463	-0,0888	-0,1516	-0,0917	0,0782	0,0182	<b>1,0000</b>

\*Correlação significativa ( $p < 0,05$ ) considerando correlação de Pearson (r) abaixo da diagonal e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>) acima da diagonal. \*\* G' (módulo elástico), G'' (módulo de perda), PT (proteína total), CN (caseína),.

## 6.2.2 Ensaios reológicos e polimorfismo genético

Os efeitos do tempo após adição do coalho sobre as propriedades reológicas: módulos G' e G'', G'/G'', tan δ e o tempo de coagulação enzimática (TCE, min) dos leites dos dezessete animais analisados durante os três períodos são apresentados na TABELA 13.

Considerando todas as amostras os valores de G' ficaram entre  $55,32 \pm 17,20$  e  $1,06 \pm 0,38$  Pa e para o G'' entre  $0,41 \pm 0,16$  a  $17,96 \pm 5,82$  Pa (decorridos 45 min de análise). Os valores encontrados para todas as amostras apresentaram variações entre eles, mas, de forma geral, os módulos dinâmicos apresentaram o padrão de comportamento esperado, inicialmente aumentaram de forma relativamente rápida e de forma mais lenta tenderam a estabilização. Hussain, Grandison e Bell et al. (2011) relataram valores de G' igual a  $19,00 \pm 1,00$  e de G'' de  $10,00 \pm 1,00$  Pa (análise realizada a 39°C e após 90 minutos de coagulação) em amostras de leite de vaca pasteurizados (raça não mencionada). Os mesmos autores em outro trabalho encontram para G' e G'' valores iguais a  $62,00 \pm 3,00$  e  $23,00 \pm 1,00$  (coagulação a 34°C) e de  $51,00 \pm 2,00$  e  $25,00 \pm 1,00$  Pa (coagulação a 39°C), respectivamente e após 90 minutos de coagulação (HUSSAIN, et al 2012), também para leite de vaca. Já Gustavsson et al. (2014) relataram para leite (bovino) fresco desnatado, em ensaios reológicos conduzidos a 32°C por 40 min, valor médio de G' igual a  $78,50 \pm 62,9$  Pa, com valor mínimo de 2,10 Pa e máximo de 312,70 Pa (valores de G'' não foram apresentados).

TABELA 13 – PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE LEITE ANALISADAS

Animal	Raça**	Período**	Propriedades reológicas e TCE				
			G, Pa***	G', Pa***	G'/G'***	tan δ	TCE***, min
1*	H	P1	23,33 ± 4,44	8,62 ± 1,16	3,11 ± 0,26	0,37 ± 0,02	9,92 ± 0,59
		P2	9,02 ± 5,70	3,51 ± 2,23	3,13 ± 0,57	0,39 ± 0,01	25,82 ± 3,41
2	H	P1	18,01 ± 1,93	5,21 ± 1,25	3,66 ± 0,49	0,28 ± 0,04	9,92 ± 1,08
		P2	40,86 ± 4,55	13,12 ± 1,59	3,68 ± 0,31	0,32 ± 0,00	12,48 ± 0,02
		P3	50,90 ± 11,45	17,39 ± 3,05	3,48 ± 0,49	0,34 ± 0,01	9,92 ± 0,01
3*	H	P1	32,75 ± 0,45	10,10 ± 0,09	3,02 ± 0,28	0,31 ± 0,02	11,46 ± 1,08
		P3	16,36 ± 0,37	5,91 ± 0,06	3,24 ± 0,38	0,36 ± 0,00	18,12 ± 0,03
4	H	P1	36,45 ± 1,68	11,52 ± 0,45	3,75 ± 0,47	0,31 ± 0,00	12,49 ± 0,01
		P2	15,51 ± 0,42	4,79 ± 0,15	4,00 ± 1,52	0,31 ± 0,01	11,46 ± 0,03
		P3	26,39 ± 6,22	8,60 ± 2,17	3,51 ± 0,27	0,33 ± 0,01	13,50 ± 0,69
5	H	P1	8,08 ± 0,12	2,60 ± 0,01	3,46 ± 0,38	0,32 ± 0,01	14,57 ± 2,52
		P2	6,12 ± 0,31	1,96 ± 0,13	3,95 ± 1,55	0,32 ± 0,02	14,53 ± 1,56
		P3	19,12 ± 5,30	6,57 ± 1,80	4,00 ± 1,43	0,34 ± 0,00	13,60 ± 0,70
6	H	P1	21,10 ± 3,45	7,27 ± 1,29	3,22 ± 0,24	0,34 ± 0,04	14,54 ± 0,10
		P2	7,69 ± 1,79	2,84 ± 0,65	3,77 ± 3,03	0,37 ± 0,00	21,21 ± 0,73
		P3	8,10 ± 0,91	3,23 ± 0,36	2,89 ± 0,25	0,40 ± 0,00	22,23 ± 1,80
7	H	P1	20,32 ± 1,27	7,04 ± 0,44	3,37 ± 0,33	0,35 ± 0,00	18,13 ± 0,88
		P2	13,65 ± 4,60	4,07 ± 1,46	3,70 ± 0,49	0,30 ± 0,01	12,48 ± 1,03
		P3	55,32 ± 17,20	17,96 ± 5,82	3,23 ± 0,21	0,32 ± 0,01	12,49 ± 0,74
8	H	P1	10,17 ± 0,68	3,62 ± 0,29	3,29 ± 0,49	0,36 ± 0,00	14,59 ± 0,72
		P2	16,25 ± 0,65	5,91 ± 0,02	3,43 ± 0,37	0,36 ± 0,02	21,20 ± 1,56
		P3	11,28 ± 0,17	3,85 ± 0,08	3,57 ± 0,54	0,34 ± 0,03	11,48 ± 0,02
9	H	P1	10,47 ± 0,50	3,46 ± 0,23	3,59 ± 0,50	0,33 ± 0,01	18,13 ± 0,01
		P2	9,27 ± 0,46	3,20 ± 0,19	3,33 ± 0,40	0,35 ± 0,00	18,13 ± 1,28
		P3	17,80 ± 1,82	6,35 ± 0,01	3,40 ± 0,30	0,36 ± 0,01	13,50 ± 0,74
10	H	P1	8,33 ± 0,54	2,96 ± 0,22	3,38 ± 0,63	0,35 ± 0,00	18,13 ± 1,29
		P2	3,78 ± 0,54	1,28 ± 0,04	3,35 ± 1,56	0,34 ± 0,01	24,75 ± 1,02
		P3	9,73 ± 0,27	3,72 ± 0,03	3,13 ± 0,35	0,38 ± 0,01	19,15 ± 0,02
11*	H	P2	32,85 ± 3,65	9,97 ± 1,28	4,24 ± 1,39	0,30 ± 0,01	9,92 ± 0,59
		P3	45,85 ± 0,80	15,37 ± 0,28	3,60 ± 0,29	0,34 ± 0,00	12,48 ± 0,01
12	H	P1	12,75 ± 0,15	4,45 ± 0,72	2,71 ± 0,49	0,35 ± 0,00	20,18 ± 1,02
		P2	13,16 ± 2,16	4,77 ± 0,72	3,18 ± 0,41	0,36 ± 0,00	18,13 ± 0,72
		P3	23,13 ± 0,05	7,24 ± 0,37	3,75 ± 0,48	0,31 ± 0,02	14,53 ± 0,73
13	H	P1	2,49 ± 0,59	0,96 ± 0,27	2,71 ± 1,06	0,38 ± 0,02	36,09 ± 2,35
		P2	1,06 ± 0,38	0,41 ± 0,16	2,44 ± 1,01	0,39 ± 0,02	44,81 ± 1,45
		P3	4,25 ± 0,87	1,66 ± 0,34	3,20 ± 1,11	0,39 ± 0,00	36,08 ± 1,29
14*	H	P1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
		P2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
15	JH	P1	35,58 ± 15,26	11,47 ± 5,13	3,32 ± 0,24	0,32 ± 0,06	9,92 ± 1,08
		P2	16,37 ± 1,01	5,17 ± 0,16	3,48 ± 0,46	0,32 ± 0,01	12,49 ± 1,02
		P3	11,85 ± 4,47	3,86 ± 1,47	3,45 ± 0,59	0,33 ± 0,00	11,45 ± 1,29
16	JH	P1	19,12 ± 0,25	5,97 ± 0,24	4,01 ± 0,83	0,31 ± 0,01	15,57 ± 0,72
		P2	36,58 ± 5,71	11,77 ± 1,54	3,68 ± 0,34	0,32 ± 0,01	12,48 ± 0,72
		P3	30,07 ± 1,64	10,53 ± 0,51	3,57 ± 0,30	0,35 ± 0,01	14,54 ± 0,73
17	JH	P1	23,06 ± 5,21	6,83 ± 1,44	3,71 ± 0,29	0,29 ± 0,00	11,46 ± 1,08
		P2	15,51 ± 1,93	5,48 ± 0,64	3,32 ± 0,26	0,35 ± 0,01	22,22 ± 1,29
		P3	8,68 ± 1,06	3,29 ± 0,49	3,17 ± 0,19	0,37 ± 0,01	26,80 ± 0,69

\*Animais avaliados em apenas dois períodos; \*\* H (Holandesa), JH (Jersolanda); P1 (maio), P2 (agosto) e P3 (dezembro). \*\*\*G' (módulo elástico), G'' (módulo de perda); G'/G'' (média obtida na varredura de frequência); TCE (tempo de coagulação enzimática) com todos os valores (média ± dp) determinados após 45 min de adição do coalho com exceção para G'/G'' na varredura de frequência.

Os resultados dos módulos G' dependem da amostra (composição química) bem como da temperatura de análise e concentração da enzima coagulante. Assim as variações encontradas nos resultados eram esperadas, porque foram analisados leites de diferentes animais e entre diferentes raças. Nesse trabalho tanto o módulos G' quanto os módulos G'' apresentaram correlação positiva com a gordura, proteína total e caseína e correlação negativa

com o pH e TCE (TABELA 12). Glantz et al. (2010) também encontraram correlação negativa entre o pH e TCE com o  $G'$ , sendo que os géis mais fortes coagularam em tempo menor, ou seja, apresentaram valores mais altos para o módulos  $G'$ . Os valores encontrados apresentaram variações entre eles, mas de forma geral os módulos dinâmicos apresentaram o padrão de comportamento para esse tipo de amostras e análise: inicialmente aumentaram de forma relativamente rápida e de forma mais lenta tenderam a estabilização. O aumento lento nos módulos, após a fase inicial, está associado à contínua fusão das micelas, o que resulta em um aumento na área de contato entre as partículas agregadas e, possivelmente, na incorporação de partículas adicionais na rede, de forma a promover rearranjos (LUCEY, 2002). Em todas as amostras, com exceção das amostras referentes ao animal de número 14 que não coagularam no tempo de análise ( $G' < 1,0$  Pa em 45 min), ambos  $G'$  e  $G''$  aumentaram com o tempo, comportamento esperado e de acordo com a citação de outros autores (ESTEVES et al., 2002; LUCEY, 2002; LAW; TAMIME, 2010; HUSSAIN; GRANDISON; BELL, et al., 2011; HUSSAIN, et al., 2012 GUSTAVSSON et al., 2014).

Do ponto de vista reológico, a agregação das caseínas e a formação do gel promovem o aumento dos módulos  $G'$  e  $G''$ . O aumento da viscosidade é observado após uma fase de latência, onde o leite permanece líquido, referente à primeira fase de coagulação (hidrólise da  $\kappa$ -CN), mas, assim que a coagulação inicia começa o aumento dos módulos,  $G'$  e  $G''$  que, reflete no aumento na firmeza do gel (FOX et al. 2000). A variação nos módulos depende do número, força e do tempo de relaxamento das ligações entre as partículas na rede do gel formado. Assim leites normalmente apresentam tempos de coagulação diferentes bem como, diferentes valores de  $G'$  e  $G''$ , mesmo para amostras que apresentam teores médios de caseína similares, o que foi observado nesse trabalho (TABELAS 9 e 13) porque, a composição proteica das caseínas e o tamanho das micelas nunca são iguais. De acordo com Fox (1993) a velocidade de endurecimento da coalhada formada a partir de pequenas micelas é mais rápida do que a formada a partir de micelas maiores, mesmo com igual concentração de caseína, o que pode ter contribuído para os resultados.

Na FIGURA 9 são apresentados os módulos dinâmicos  $G'$  e  $G''$  em função do tempo para o leite dos animais (10, 16, 13 e 14), pois das amostras analisadas são exemplos de amostras com perfil em relação ao tempo de coagulação considerados como adequado (entre 12,48 e 15,57 min); intermediário (entre 18,73 e 24,75 min), lento ( $> 36$  min) e não coagulável no tempo do experimento, FIGURA 9 (a, b, c, d), respectivamente. Para os demais leites analisados os valores de TCE ficaram entre 9,92 e 26,80 min (TABELA 13). De acordo

com Zannoni e Annibaldi (1981) um leite é considerado mais adequado para produção de queijo, via coagulação enzimática, quando a coagulação tem início entre 11 a 18 min após a adição do coalho.

No comportamento reológico das amostras dos animais 16 e 10 (FIGURAS 9a e 9b), pode-se observar que essas amostras corresponderam ao padrão de comportamento esperado para coagulação enzimática do leite (FOX, 2000; LUCEY, 2002; LAW; TAMIME, 2010), ou seja, inicialmente aumentaram de forma relativamente rápida e de forma mais lenta tenderam a estabilização. Já nas amostras de leite do animal 13 (FIGURA 9c) que apresentaram TCE elevado (acima de 36 min, nos três períodos de análise) pode-se observar o comportamento típico, porém menos intenso e, as amostras de leite do animal 14 (FIGURA 9d) não coagularam no tempo de análise (45 min), nos dois períodos analisados, sendo assim foram consideradas amostras não coaguláveis (NC). Os leites desses dois animais (13 e 14) não são indicados para produção de queijos (via coagulação enzimática). O destino mais adequado para leites com essas características é a produção de leite fluido (pasteurizado ou submetido à ultra-alta temperatura), ou para outros produtos que não envolvam a etapa de coagulação enzimática (DEL PRATO, 2001).

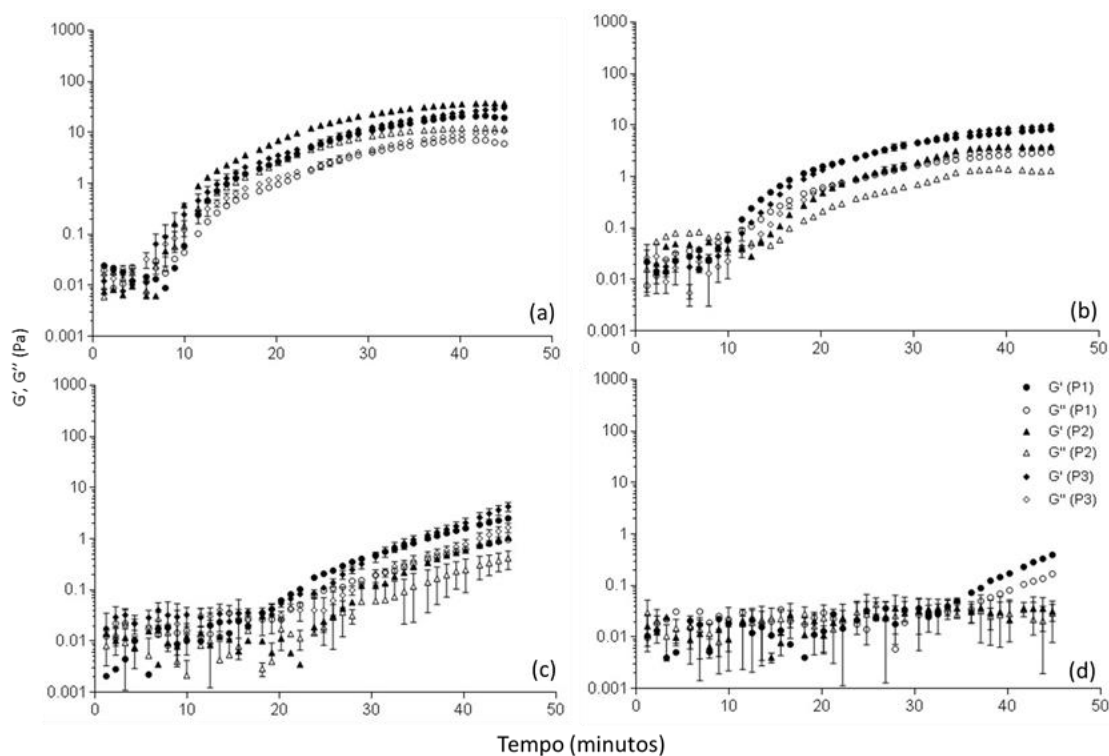


FIGURA 9- ALTERAÇÕES NOS  $G'$  E  $G''$  EM FUNÇÃO DO TEMPO NOS PERÍODOS DE COLETA REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b); 13 (c) e 14 (d).

As demais amostras analisadas apresentaram comportamento reológico similar ao demonstrado nas FIGURAS 9a e 9b. Na TABELA 13 são apresentados os valores de TCE (min) de todas as amostras e, na FIGURA 10 o gráfico de estimativas desse parâmetro, nos três períodos de análise, separando os animais por raça. De acordo com o teste de modelos de efeitos (TABELA 10) não houve diferença significativa para o TCE entre os períodos de análise, entre as raças, e na interação entre eles. Entretanto, como pode ser observado na TABELA 13 houve variabilidade desses índices entre os leites analisados.

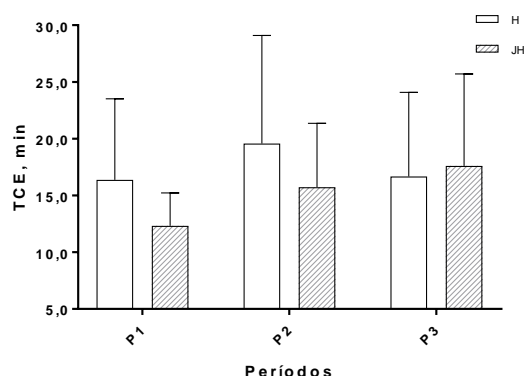


FIGURA 10- TEMPO DE COAGULAÇÃO ENZIMÁTICA (TCE) EM FUNÇÃO DOS PERÍODOS DE ANÁLISE P1(MAIO), P2 (AGOSTO) E P3 (DEZEMBRO)

As varreduras de frequência obtidas a partir de medidas de cisalhamento oscilatório das amostras de leite dos animais 16 (a); 10 (b); 13 (c) e 14 (d) são apresentadas na FIGURA 11. Os valores de  $G'$  foram superiores a  $G''$  em toda a faixa de frequência, mostrando comportamento predominantemente elástico (gel) para as amostras de leite dos animais 16 e 10 (FIGURAS 11a e 11b) e com leve dependência da frequência, sendo considerados como géis fracos. Quando os módulos,  $G'$  e  $G''$  são dependentes da frequência com  $G'$  maior que  $G''$  e, não apresentam cruzamento entre eles, fenômeno conhecido como *crossover*, mesmo com aumento da frequência, o sistema é caracterizado como gel fraco (STEFFE, 1996; CHAMBERLAIN; RAO, 2000). Já para as amostras de leite do animal 13 (amostras que apresentaram  $TCE > 36$  min, TABELA 13), ao final da varredura de frequência, nos períodos P1 e P2 ocorreu *crossover* (FIGURA 11c), ou seja, houve a interseção entre os dois módulos perdendo a estabilidade do gel formado. De fato leites que demoram a iniciar a coagulação formam géis mais frágeis (CASSANDRO et al., 2008; CECCHINATO et al., 2011), o que justifica a perda da estabilidade do gel formado nas amostras de leite do animal 13. As amostras NC, do animal 14, não formaram gel, essas amostras permaneceram líquidas até o final da análise, e como se observa na FIGURA 11 (d), os módulos  $G'$  e  $G''$  ficaram abaixo

de 1 Pa, o mesmo relatado por Glantz et al. (2010) em estudo realizado com leite de animais da raça Swedish Red (Sueca vermelha). As demais amostras analisadas apresentaram comportamento similar às amostras representadas na FIGURA 11 (a) e (b) com dados reológicos apresentados na TABELA 13. Assim, todos os géis, nas condições estudadas, apresentaram-se como géis fracos, pois apresentaram uma leve dependência com a frequência o que foi confirmado pela razão  $G'/G''$  que foi menor que 10 (TABELA 13), característica de géis fracos (STEFFE, 1996; MORAES et al. 2011). O menor valor para essa propriedade foi de 2,44 referente a amostra de leite do animal 13 no P3 que apresentou o maior TCE (44,81 min) e, o maior valor encontrado (4,24) foi para amostra do animal 11 no P2 que apresentou o menor TCE (9,92 min). Hussain, Grandison e Bell (2011), Hussain et al. (2012) e Sandra et al. (2012) também relataram que  $G'$  e  $G''$  apresentaram leve dependência da frequência, os módulos dinâmicos aumentaram com a frequência (0,1-10,0 Hz) caracterizando os géis formados como fracos.

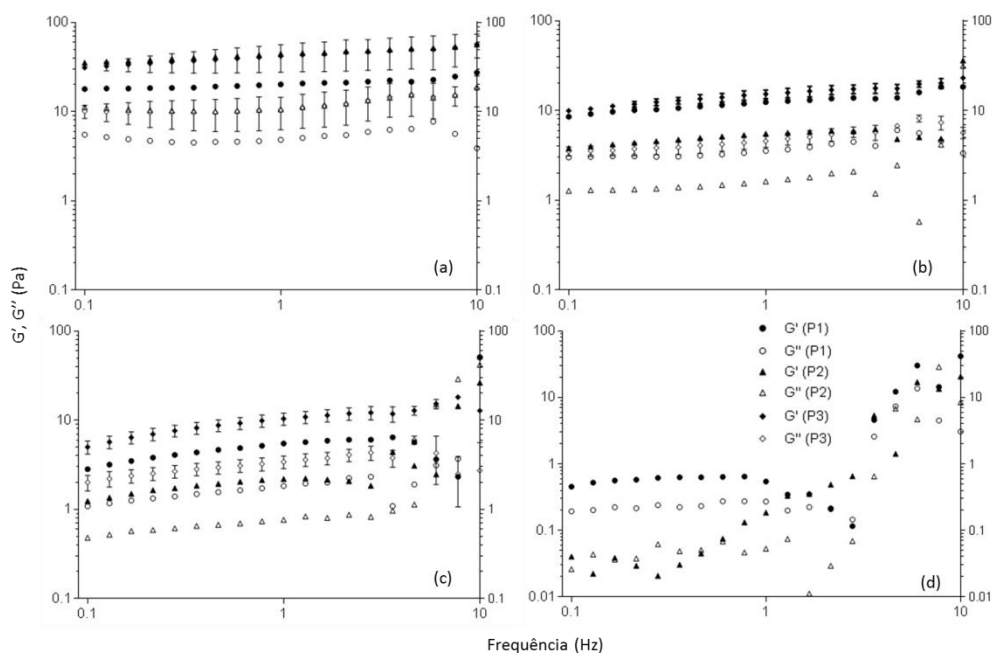


FIGURA 11- MÓDULOS  $G'$  E  $G''$  EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA NOS PERÍODOS DE COLETA REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b); 13 (c) E 14 (d).

As varreduras de frequência podem fornecer uma indicação do tipo e natureza das interações presentes na rede proteica (coalhada). As amplitudes dos módulos foram diferentes entre as amostras e, isto pode ser explicado pelas diferentes resistências apresentadas pelos géis obtidas após o período de formação do mesmo (45 min). Na coagulação enzimática, as interações que ocorrem na matriz proteica têm menos tempo para relaxar se o tempo de

estresse aplicado for menor, assim, os módulos dinâmicos aparecem mais altos nas frequências mais altas (LUCEY, 2002; MISHRA; GOVINDASAMY-LUCEY; LUCEY, et al., 2005).

Outro fator a considerar é que quanto maior o valor de  $G'$ , maior é o caráter sólido do gel (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998). Na FIGURA 11a (que representa as amostras do animal 16) observam-se valores mais altos para  $G'$  e  $G''$ , comparando com os resultados apresentados nas FIGURAS (11b e 11c), e como pode ser observado na TABELA 13, essas amostras apresentaram os menores valores de TCE (min) o que corrobora com Cecchinato et al. (2011) que relataram que quanto mais tempo o leite demora para iniciar a coagulação, a coalhada possui menos tempo para endurecimento e consequentemente o gel formado é mais fraco. O mesmo aconteceu para demais amostras.

Na TABELA 13 pode-se observar os valores de  $\tan \delta$  determinados após 45 min de adição do coalho, os valores médios encontrados ficaram entre 0,28 e 0,39 e, na FIGURA 12, pode-se observar o comportamento desse parâmetro em função do tempo de análise, para os leites dos animais 10, 16 e 13. Em geral, os valores de  $\tan \delta$  diminuíram durante a formação da coalhada. A  $\tan \delta$  diminui no ponto de gelificação e atinge valores próximos a 0,3 (LUCEY, 2002). Hussain, Grandison e Bell (2011) relataram valores médios iguais a  $0,50 \pm 0,01$  para leite de vaca e para Hussain et al. (2012) os valores foram mais próximos ao encontrados nesse trabalho,  $0,30 \pm 0,01$  porém, ambos com valores determinados após 90 min de análise. Para todas as amostras houve uma diminuição da  $\tan \delta$  com a formação da coalhada, o mesmo relatado por Esteves et al. (2002); Hussain et al. (2012); Sandra et al. (2012). Valor de  $\tan \delta$  menor que 1,0 é uma característica de géis (STEFFE, 1996; SCHARAMM, 2006). Todas as amostras coaguladas apresentaram essa característica e, observa-se uma correlação positiva do TCE com a  $\tan \delta$  ( $0,6963, p < 0,05$ ), TABELA 12.

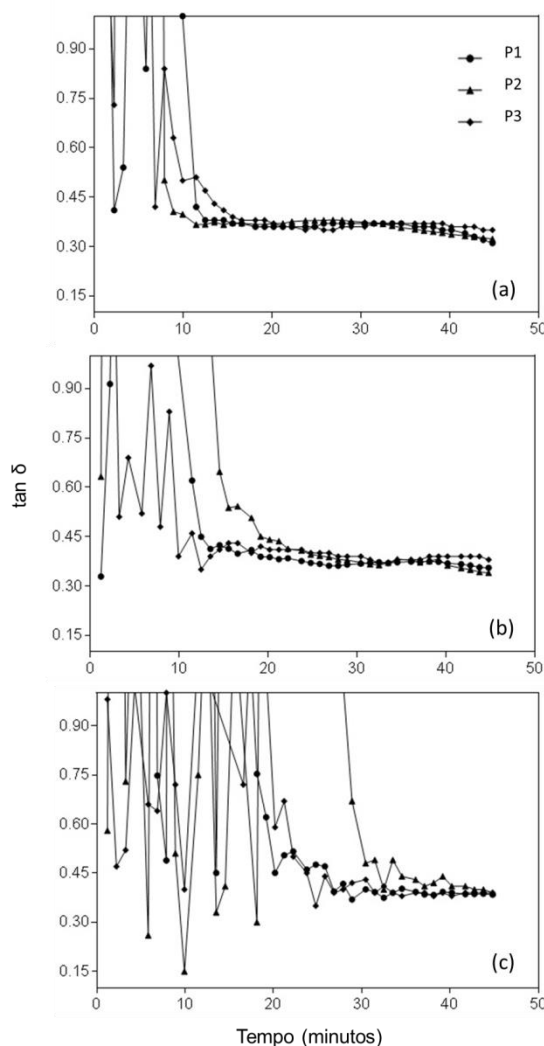


FIGURA 12 – VARIAÇÃO DA  $\tan \delta$  EM FUNÇÃO DO TEMPO REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a); 10 (b) E 13 (c).

Para verificar o comportamento do gel após 45 min de coagulação realizou-se experimento para as amostras do P3 também em 60 min de análise. Leites com boa propriedade de coagulação devem iniciar a formação do gel antes de 18 minutos e completar a formação do gel em 30 minutos, porém nem todos os leites apresentam essa característica. Após a formação do gel e antes de iniciar a sinérese os módulos  $G'$  e  $G''$  atingem um patamar. Na FIGURA 13 (a, b, c) pode-se observar que esse patamar foi alcançado próximo aos 45 min de coagulação, após esse tempo e até completar os 60 min, continuaram relativamente constantes para as amostras de leite dos animais 16, 10 e 13. Em algumas amostras depois do aumento dos módulos  $G'$  e  $G''$  ocorre pequena diminuição do valor desses módulos e na sequencia tendem a estabilização. Essas pequenas variações ocorrem em função de rearranjos das ligações entre as micelas de caseína (LUCEY, 2002). Karlsson; Ipsen



e Ardo (2007b) relataram que  $G'$  e  $G''$  atingiram valores de patamar em um tempo de aproximadamente 50 min, o mesmo encontrado por Hussain et al. (2012).

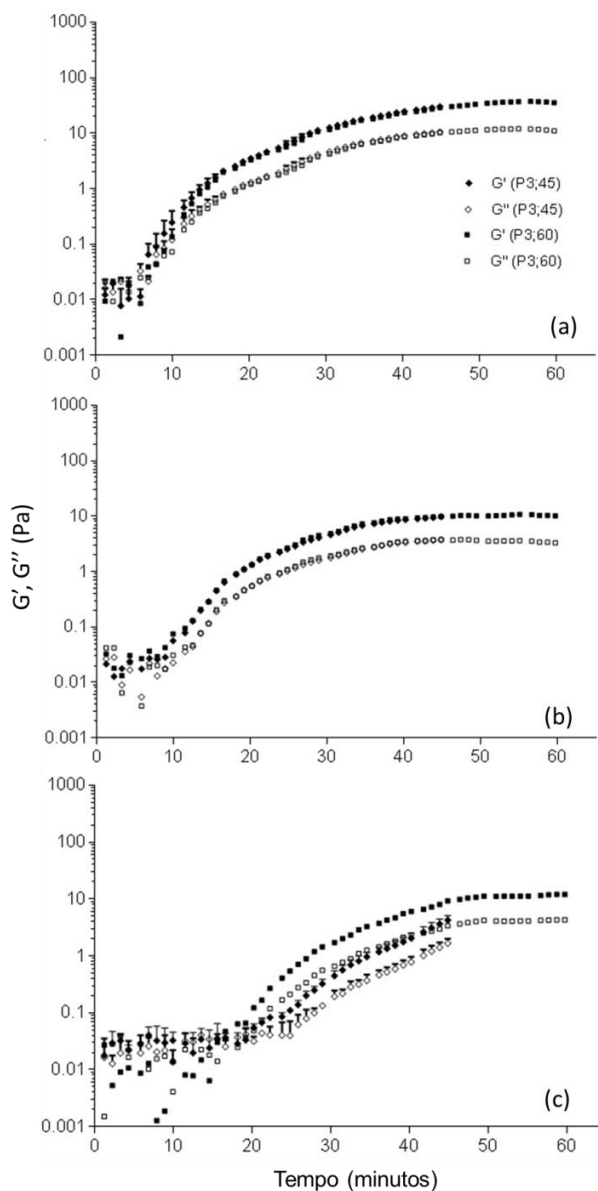


FIGURA 13 - ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS  $G'$  E  $G''$  EM FUNÇÃO DO TEMPO EM 45 E 60 MINUTOS DE ANÁLISE NO PERÍODO P3, REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a), 10 (b) E 13 (c)

A FIGURA 14 (a, b e c) apresenta o comportamento dos módulos  $G'$  e  $G''$  na varredura de frequência aplicada (0,1 a 10 Hz), com 45 e 60 min de coagulação. Para a amostra de leite do animal 16 (FIGURA 14a) foi observada uma leve diminuição dos valores dos módulos com tempo de coagulação de 60 min, já para a amostra de leite do animal 10 (FIGURA 14 b) os 15 min a mais de análise não interferiram no comportamento do  $G'$  e  $G''$ . A amostra do animal 13 (FIGURA 14c) que apresentou um longo TCE ( $> 36$  min), com 60 min de análise pode-se observar que houve um aumento do  $G'$  e  $G''$  melhorando a estrutura

do gel formado. Entretanto, leites com essa característica, longo TCE, não são ideais para produção de queijos, pois, apresentam coalhadas mais frágeis o que leva a perda de mais caseína e gordura no soro (FOX, 1993, LUCEY et al., 2002) o que pode comprometer a estrutura da massa do queijo e diminuir o rendimento. As demais amostras analisadas apresentaram comportamento similar às amostras dos animais 10 e 16.

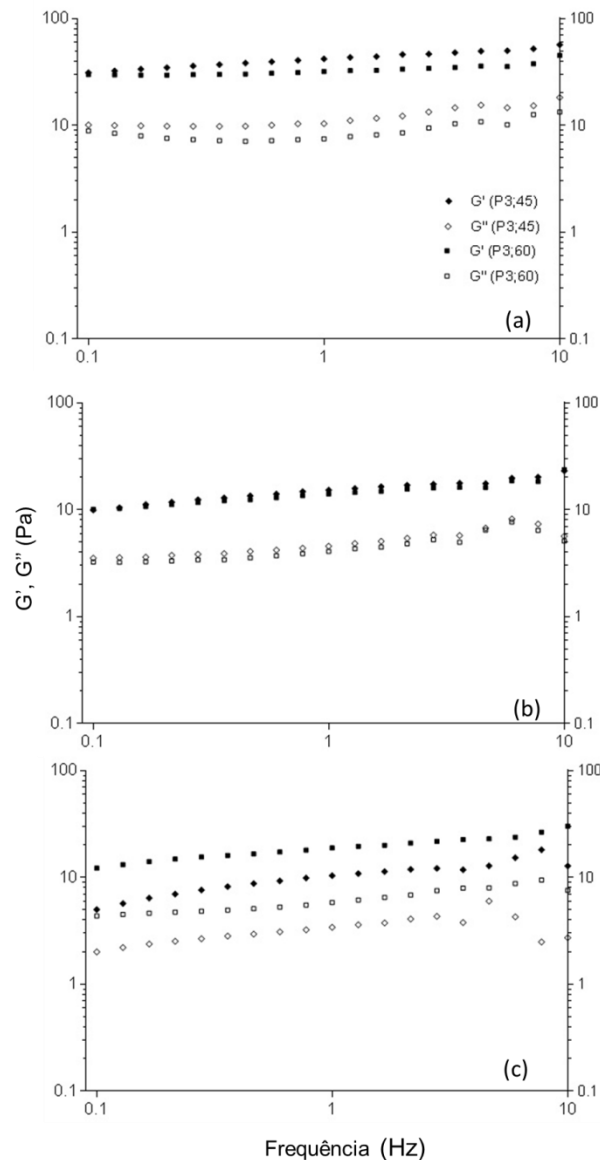


FIGURA 14 - ALTERAÇÕES NOS MÓDULOS  $G'$  E  $G''$  EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA EM 45 E 60 MINUTOS DE ANÁLISE NO PERÍODO P3, REFERENTE AOS LEITES DOS ANIMAIS 16 (a), 10 (b) E 13 (c)

As variantes alélicas, de cada animal, determinadas para os genes da  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN e  $\beta$ -Lg estão apresentadas na TABELA 14. Para  $\kappa$ -CN os genótipos encontrados foram AA; AB e BB; para a  $\beta$ -CN, A1A2 e A2A2 e para  $\beta$ -Lg, AA; AB e BB. As variantes genéticas das

proteínas podem influenciar na composição e no comportamento do leite durante seu processamento (PATERSON; MAGGIBBON; HILL, 1999; MARIANI et al., 2002; BONFATTI et al., 2008; PENASA et al., 2010). De acordo com a literatura (HALLÉN et al., 2008; BONFATTI et al., 2010) os alelos B de ambas  $\kappa$ -CN e  $\beta$ -CN apresentam influência sobre a coagulação em contraste com os alelos A e E que, estão associados a leites que apresentam fraca propriedade de coagulação e a leites que não coagulam. Poulsen et al. (2017) identificaram amostras não coaguláveis (NC) em leites de vacas Holandesas associaram ao alótipo AE da  $\kappa$ -CN. De acordo com autores, os leites com essa característica foram caracterizados por micelas de caseína maiores e menor conteúdo relativo de  $\kappa$ -CN, enquanto que o teor total de proteínas não diferiu entre os alótipos identificados A, B e AE. A amostra que não coagulou (referente ao animal 14) apresentou genótipo AA para  $\kappa$ -CN e o segundo pior resultado para coagulação, TCE > 36 min (animal 13) apresentou genótipo AB para  $\kappa$ -CN. Esses dois resultados estão de acordo com a literatura, porém, outros leites provenientes dos animais (5 e 8), por exemplo, apresentaram tempo adequado de coagulação e o genótipo para  $\kappa$ -CN foi AA, e as demais amostras de leite com esse perfil para  $\kappa$ -CN apresentaram valores de TCE intermediários. O animal 11 foi o único que apresentou genótipo BB para a  $\kappa$ -CN e os valores de TCE ficaram abaixo de 13 min. Já Poulsen et al. (2017) não encontraram diferenças para os tempos de coagulação para leites com alelos A e B para  $\kappa$ -CN. O alelo B da  $\beta$ -CN, também apresenta influência positiva sobre as propriedades de coagulação do leite (HALLÉN et al., 2007; HALLÉN et al., 2008), porém nenhum animal apresentou o alelo B para essa fração da caseína. Dos animais analisados, 11 apresentaram genótipos A1A2 e 06 apresentaram genótipos A2A2 o que vem ao encontro do relatado na literatura, em que as variantes A1 e A2 da  $\beta$ -CN, são as mais comumente encontradas em vacas leiteiras (FARREL et al., 2004). Ainda, o alelo A1 está relacionado a problemas de alergia ao leite em humanos e sua frequência é maior em raças como a Holandesa e Pardo-Suíça e, intermediária na raça Jersey (VERCESI FILHO, 2011). Portanto, além dos alelos A1 e A2 da  $\beta$ -CN apresentarem leites associados a menor desempenho em relação à coagulação, o alelo A1 está associado à alergia em humanos.

TABELA 14- GENOTIPAGEM PARA O GENES DA  $\kappa$ -CN,  $\beta$ -CN E  $\beta$ -Lg

Animal	Raça**	Genótipos			Período**	TCE***, min
		$\kappa$ -CN	$\beta$ -CN	$\beta$ -Lg		
1*	H	AA	A2A2	AA	P1	9,92 $\pm$ 0,59
					P2	25,82 $\pm$ 3,41
2	H	AB	A1A2	AB	P1	9,92 $\pm$ 1,08
					P2	12,48 $\pm$ 0,02
					P3	9,92 $\pm$ 0,01
3*	H	AB	A1A2	AB	P1	11,46 $\pm$ 1,08
					P3	18,12 $\pm$ 0,03
4	H	AB	A1A2	BB	P1	12,49 $\pm$ 0,01
					P2	11,46 $\pm$ 0,03
					P3	13,50 $\pm$ 0,69
5	H	AA	A1A2	BB	P1	14,57 $\pm$ 2,52
					P2	14,53 $\pm$ 1,56
					P3	13,60 $\pm$ 0,70
6	H	AA	A2A2	AB	P1	14,54 $\pm$ 0,10
					P2	21,21 $\pm$ 0,73
					P3	22,23 $\pm$ 1,80
7	H	AB	A1A2	AB	P1	18,13 $\pm$ 0,88
					P2	12,48 $\pm$ 1,03
					P3	12,49 $\pm$ 0,74
8	H	AA	A2A2	AA	P1	14,59 $\pm$ 0,72
					P2	21,20 $\pm$ 1,56
					P3	11,48 $\pm$ 0,02
9	H	AA	A2A2	AA	P1	18,13 $\pm$ 0,01
					P2	18,13 $\pm$ 1,28
					P3	13,50 $\pm$ 0,74
10	H	AA	A2A2	AA	P1	18,13 $\pm$ 1,29
					P2	24,75 $\pm$ 1,02
					P3	19,15 $\pm$ 0,02
11*	H	BB	A2A2	AA	P2	9,92 $\pm$ 0,59
					P3	12,48 $\pm$ 0,01
12	H	AA	A1A2	AA	P1	20,18 $\pm$ 1,02
					P2	18,13 $\pm$ 0,72
					P3	14,53 $\pm$ 0,73
13	H	AB	A1A2	AB	P1	36,09 $\pm$ 2,35
					P2	44,81 $\pm$ 1,45
					P3	36,08 $\pm$ 1,29
14*	H	AA	A1A2	AB	P1	n.d
					P2	n.d
15	JH	AB	A1A2	AA	P1	9,92 $\pm$ 1,08
					P2	12,49 $\pm$ 1,02
					P3	11,45 $\pm$ 1,29
16	JH	AB	A1A2	AB	P1	15,57 $\pm$ 0,72
					P2	12,48 $\pm$ 0,72
					P3	14,54 $\pm$ 0,73
17	JH	AB	A1A2	AB	P1	11,46 $\pm$ 1,08
					P2	22,22 $\pm$ 1,29
					P3	26,80 $\pm$ 0,69

\*Animais analisados em dois períodos. \*\* H (holandesa), JH (Jersolanda); P1 (Maio), P2 (Agosto), P3 (Dezembro).\*\*\*TCE (tempo de coagulação enzimática)

As proteínas do soro também podem influenciar de forma indireta os resultados das PCL (LODES et al., 1997; CELIK, 2003; BOBE, et al., 2004; MOLINA et al., 2006).

Summer et al. (2002) por exemplo, observaram que vacas com  $\beta$ -Lg tipo A apresentaram um leite com maior teor de proteínas do soro, enquanto vacas com  $\beta$ -Lg tipo B produziram um leite em média, mais rico em caseína, com efeitos significativos sobre a produtividade, particularmente para queijo, pois melhoram a PCL de modo geral. De acordo com resultados para a  $\beta$ -Lg, os alelos AB e AA foram predominantes e apenas um animal apresentou o alelo BB (TABELA 14).

As FIGURAS 15 e 16 apresentam a escala de cores gerada pelo método *two-way-joining* para os genótipos da  $\kappa$ -CN e  $\beta$ -CN e para  $\beta$ -Lg, respectivamente, em função do TCE e a variação da caseína e proteína total. De acordo com a FIGURA 15, pode-se observar que o maior TCE está relacionado com raça Holandesa com alelo AB para  $\kappa$ -CN e A1A2 para a  $\beta$ -CN (sinalizada pela coloração vermelha no gráfico).

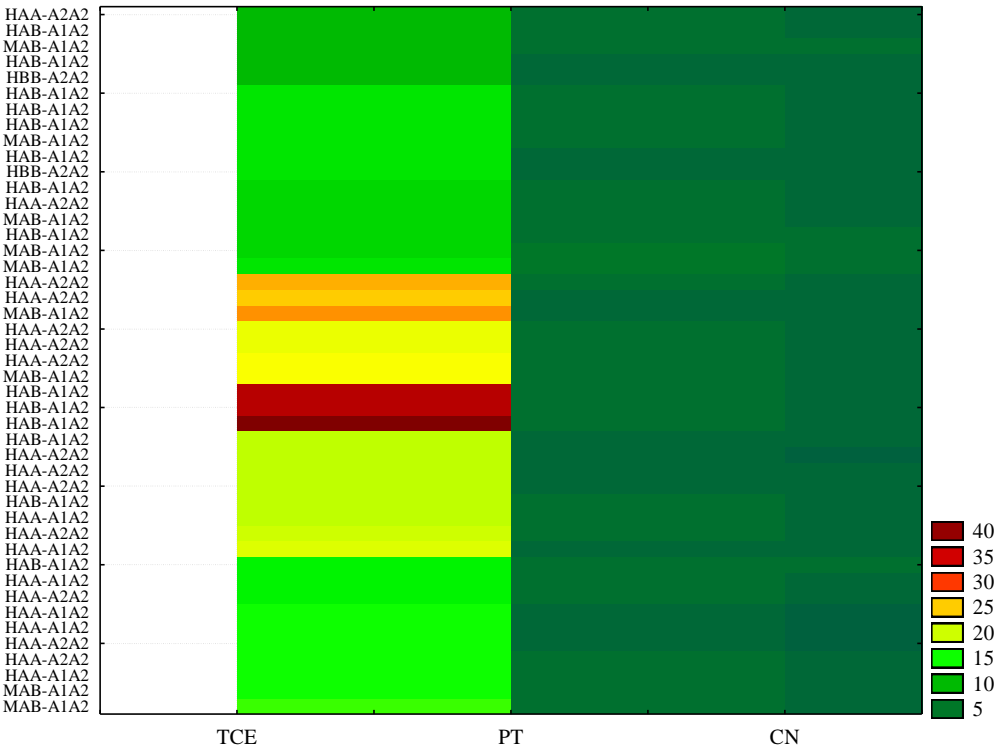


FIGURA 15- ANÁLISE DE AGRUPAMENTO *TWO-WAY JOINING* DOS GENÓTIPOS DA CASEÍNA ( $\kappa$ -CN e  $\beta$ -CN) E RAÇAS (H: HOLANDESA; M: MESTIÇA) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO (TCE), PROTEÍNA TOTAL (PT) E CASEÍNA (CN)



### 6.3 CONCLUSÕES

Entre os leites analisados foi possível observar variações na composição química, células somáticas, nos parâmetros reológicos e no polimorfismo das proteínas ( $\kappa$ -CN;  $\beta$ -CN e  $\beta$ -Lg) e, durante os três períodos de análise não houve variação significativa do índice de temperatura e umidade (ITU). Os géis apresentaram comportamento de gel fraco com exceção, das amostras de leite do animal 14 que não coagularam nos 45 minutos de análise. Houve variações no tempo de coagulação enzimática bem como nos módulos de armazenamento entre as amostras dos animais nos diferentes períodos de análise. Com relação ao polimorfismo, para  $\kappa$ -CN os genótipos identificados foram: AA; AB e BB; para  $\beta$ -CN: A1A2 e A2A2 e, para  $\beta$ -Lg: AA e AB. De maneira geral os leites responderam bem ao processo de coagulação enzimática, mas os leites provenientes de dois animais (13 e 14) foram considerados inadequados para a produção de queijos, pois, os leites do animal 13 iniciaram a coagulação após 36 min e do 14 que não coagularam.

## **7 CONCLUSÕES FINAIS**

Nesse trabalho foi possível constatar que no verão, caracterizado por elevado índice de temperatura e umidade (ITU), as amostras de leite analisadas apresentaram fraco desempenho com relação à coagulação enzimática e muitas das amostras nem sequer coagularam no tempo proposto. No outono ou em períodos com valores de ITU considerados adequados, com temperaturas mais amenas, as amostras apresentaram tempos de coagulação e firmeza da coalhada, adequados para produção de queijos via coagulação enzimática. No Brasil as pesquisas com relação a esse parâmetro ainda são escassas, entretanto, em virtude do cenário nacional, caracterizado por crescimento constante, pode-se constatar a importância de implementar pesquisas que contribuam com a caracterização dos rebanhos leiteiros no país a fim de classificar animais com produção de leite com características mais adequadas a produção de queijos (com melhor PCL) e com isso fortalecer o setor, proporcionando maior qualidade do produto final e rentabilidade para o laticínio e para o produtor.



## REFERÊNCIAS

- ALEANDRI, R.; SCHNEIDER, J. C.; BUTTAZZONI, L. G. Evaluation of milk for cheese production based on milk characteristics and Formagraph measures. **Journal Dairy Science**, v.72, p.1967-1975, 1989.
- ALMEIDA, I. F. M. Desenvolvimento e caracterização de oleogeles. Dissertação (mestrado em Tecnologia Farmacêutica). Universidade do Porto, Porto, 2002
- ANNIBALDI, S.; FERRI, G.; MORA, R. Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: Tipizzazione lattodinamografica. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 2, n.28, p.115-126, 1977.
- AULDIST, M. J.; MULLINS, C.; O'BRIEN, B.; GUINEE, T. A comparison of the Formagraph and low amplitude strain oscillation rheometry as methods for assessing the rennet coagulation properties of bovine milk. **Milchwissenschaft**, v. 56, p. 89-92, 2001.
- AULDIST, M.; MULLINS, C.; O'BRIEN, B.; O'KENNEDY, B. T.; GUINEE, T. Effect of cow breed on milk coagulation properties. **Agrar-Verlag Allgäu**, v.57, n. 3, p. 140-143, 2002.
- AULDIST, M. J.; JOHNSTON, K. A.; WHITE, N. J.; FITZSIMONS, W. P.; BOLAND, M. J. A comparison of the composition, coagulation characteristics and cheesemaking capacity of milk from Friesian and Jersey dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.71, p. 51-57, 2004.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal Dairy Science**, v.77, p. 2044-2050, 1994.
- BANNERMAN, D. D.; SPRINGER, H. R.; PAAPE, M. J.; KAUF, A. C.; GOFF, J.P. Evaluation of breed-dependent differences in the innate immune responses of Holstein and Jersey cows to *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.291-301, 2008.
- BARROSO, A.; DUNNER, S.; CAÑON, J. Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Journal Animal Science**, v. 76, p. 1535-1538, 1998.
- BERNABUCCI, U.; LACETERA N.; BAUMGARD L. H.; RHOADS R. P.; RONCHI B.; NARDONE A. Metabolic and hormonal adaptations to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v.4, p.1167-1183, 2010.
- BIJL, E.; VRIES, R. DE.; VAN VALENBERG, H. J. F.; VAN HOOIJDONK, T. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: genetic variants and glycosylation of  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 34, n. 1, p. 135-141, 2014.
- BITTANTE, G. Modeling rennet coagulation time and curd firmness of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5821-5832, 2011.

BITTANTE, G.; PENASA, M.; CECCHINATO, A. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6843-6870, 2012.

BOBE, G., D. C. BEITZ, A. E. FREEMAN, AND G. L. LINDBERG. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversedphase high-performance liquid chromatography. **Journal do Agricultural Food Chemistry**, v.46, p.458-463, 1998.

BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2797-2804, 1999.

BOBE, G.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L.; BEITZ, D. C. The influence of milk protein phenotypes on fatty acid composition of milk from Holstein cows. **Milchwissenschaft**, v. 59, p. 3-6, 2004.

BOHMANOVA J.; MISZTAL I.; COLE J. B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1947-1956, 2007.

BONIZZZI, I.; BUFFONI, J. N.; FELIGINI, M. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. **Journal of Chromatography**, v. 1216, p. 165-168, 2009.

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.; CECCHINATO, A.; GALLO, L.; CARNIER, P. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. **Journal of Chromatography A**, v. 1195, p. 101-106, 2008.

BONFATTI, V.; DI MARTINO, G.; CECCHINATO, A.; DEGANI, L.; CARNIER, P. Effects of  $\beta$ - $\kappa$ -casein (CSN2-CSN3) haplotypes,  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) genotypes, and detailed protein composition on coagulation properties of individual milk of Simmental cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3809-3817, 2010.

BONFATTI, V.; DI MARTINO, G.; CARNIER, P. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for the prediction of detailed protein composition and contents of protein genetic variants of individual milk of Simmental cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5776-5785, 2011.

BONFATTI, V.; TUZZATO, M.; CHIAROT, G.; CARNIER, P. Variation in milk coagulation properties does not affect cheese yield and composition of model cheese. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 139-145, 2014.

BOURAOUI, R.; LAHMAR, M.; MAJDOUB, A.; DJEMALI, M.; BELYEA, R. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. **Animal Research** v. 51; p. 479-491, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 20 de setembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº7, de 03 de maio de 2016. Diário Oficial da União, **Diário Oficial da União**, de 04 maio. 2016. Seção 1, p. 11.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A.V. P. **Qualidade do leite brasileiro e os desafios para atendimento das exigências internacionais**. In: ZOCCAL, R. et al. Leite: uma cadeia produtiva em transformação. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 235-234, 2004.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentration of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2964-2971, 1997.

BROWN, R. J.; COLLINGE, S. K. Actual milk coagulation time and inverse of chymosin activity. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 956-958, 1986.

BROWN-BRANDL T. M.; NIENABER J. A.; EIGENBERG R. A.; FREETLY H. C.; HAHN G. L. Thermoregulatory responses of feeder cattle. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, p. 149-157, 2003.

BUCHBERGER, J. Genetics polymorphisms of milk protein: differences between breeds. *Bull. Int. Dairy Fed*, v. 304, p. 5-6, 1995.

BYTYQI, H.; ZAUGG. U.; SHERIFI, K.; HAMIDI, A.; GJONBALAJ, M.; MUJI, S.; MEHMETI, H. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 2, p. 173-183, 2010.

CASSANDRO, M.; COMIN, A.; OJALA, M.; DAL ZOTTO, R.; DE MARCHI, M.; GALLO, L.; CARNIER, P.; BITTANTE, G. Genetic parameter of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 371-376, 2008.

CE. Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/>>. Acesso em: 29 de setembro de 2016.

CECCHINATO, A.; DE MARCHI, M.; GALLO, L.; BITTANTE, G.; CARNIER, P. Mid-infrared spectroscopy predictions as indicator traits in breeding programs for enhanced coagulation properties of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5304-5313, 2009.

CECCHINATO, A.; PENASA, M.; DE MARCHI, M.; GALLO, L.; BITTANTE, G.; CARNIER, P. Genetic parameters of coagulation properties, milk yield, quality, and acidity estimated using coagulating and noncoagulating milk information in Brown Swiss and Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4205-4213, 2011.

CELIK, S. Beta-lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. **International Dairy Journal**, v.13, n.9, p. 727-731, 2003.

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. Concentration dependence of viscosity of acido-hydrolyzed amylopectin solution. **Food Hydrocolloids**, v. 14, p.163-171, 2000.

CIPOLAT-GOTET, C., CECCHINATO, A.; DE MARCHI, M.; PENASA, M.; BITTANTE, G. Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6806-6819, 2012.

COMIN, A.; CASSANDRO, M.; POVINELLI, M.; BITTANTE, G. Genetic aspects of milk coagulation properties in Italian Holstein cows. **Journal Animal Science**, v.4, p.11-14, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas para a Agropecuária, v.3, p.1-130, 2015. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br>>. Acesso em maio 2017.

CORRADINI, C. **Chimica e Tecnologia del latte**. Milano: Tecniche Nuove, Milano, 1995.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles-Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2010.

DAL ZOTTO, R.; MARCHI, M.; CECCHINATO, A.; PENASA, M.; CASSANDRO, M.; CARNIER, P.; GALLO, L.; BITTANTE, G. Reproducibility and Repeatability of Measures of Milk Coagulation Properties and Predictive Ability of Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.4103-4112, 2008.

DE MARCHI, M.; DAL ZOTTO, R.; CASSANDRO, M.; BITTANTE, G. Milk Coagulation Ability of Five Dairy Cattle Breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3986-3992, 2007.

DE MARCHI, M.; BITTANTE, G.; DAL ZOTTO, R.; DALVIT, C.; CASSANDRO, M. Effect of Holstein Friesian and Brown Swiss Breeds on Quality of Milk and Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.4092-4102, 2008.

DE MARCHI, M.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C. P.; CECCHINATO, A.; DAL ZOTTO, R.; CASSANDRO, M.; PENASA, M.; BITTANTE, G. Prediction of coagulation properties, titratable acidity and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 423-432, 2009.

DEL PRATO, O. S. **Trattato di Tecnologia Casearia**. Bologna: Calderini Edagricole, 2001.

DE PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. C.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto Laticínio Cândido Tostes**, n.367/368, v. 64, p. 19-25, 2009.

DI STASIO L.; MARIANI P. The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. **Zootecnica e Nutrizione Animale**. v. 26, n. 3, 69-90, 2000.

DU PREEZ, J. H.; HATTING, P. J.; GIESECKE, W. H.; EISENBERG, B. E. Heat stress in dairy cattle and other livestock under Southern African conditions. III. Monthly temperature-humidity index mean values and their significance in the performance of dairy cattle. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 57, p.243-248, 1990.

ESTEVEES, C. L. C.; LUCEY, J. A.; PIRES, E. M.V. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 427-434, 2002.

FAGAN, E. P.; JOBIM, C. C.; CALIXTO Jr., M.; SILVA, M. S.; SANTOS, T. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 3, p.309-316, 2010.

FARRELL Jr. H. M.; HIMENEZ-FLOREZ, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk - Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**. v. 87, p. 1641-1674, 2004.

FARRELL Jr. H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Lemos Editora, 2000.

FORMAGGIONI, P.; MALACARNE, M.; SUMMER, A.; FOSSA, E.; MARIANI, P. Milk with abnormal acidity. The role of phosphorus content and the rennet-coagulation properties of Italian Friesian herd milks. **Annali...** della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma, v. 21, n. 5, p. 261-268, 2001.

FORMAGGIONI, P.; SANDRI, S.; FRANCESCHI, P.; MALACARNE, M.; MARIANI, P. Milk acidity, curd firming time, curd firmness and protein and fat losses in the Parmigiano-Reggiano cheesemaking. **International Journal Animal Science**, v. 4, n. 2, p. 239-241, 2005.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol 1. 2nd Ed. London , U. K. : Chapman and Hall. 1993.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. London: Chapman & Hall, 1998.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, T.P. **Fundamentals of Cheese Science**. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers. 2000.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v.18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FREDERIKSEN, P. D.; ANDERSEN, K. K.; HAMMERSHØJ, M.; H. D. POULSEN, H.D.; J. SØRENSEN, J.; BAKMAN, M.; QVIST, K. B.; LARSEN, L. B. Composition and effect of blending of noncoagulating, poorly coagulating, and well-coagulating bovine milk from individual Danish Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4787-4799, 2011.

FREYER, G.; KONIG, S.; FISCHER, B.; BERGFELD, U.; CASSELL, B. G. Invited review: crossbreeding in dairy cattle from a German perspective of the past and today. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.3725-43, 2008.

GANTNER, V.; MIJIĆ, P.; KUTEROVAC, K.; SOLIĆ, D.; GANTNER, R. Temperature-humidity index values and their significance on the daily production of dairy cattle. **Mljekarstvo**, v. 61, n. 1, p. 56-63, 2011.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 473-483, 2005.

GEARY, U.; LOPEZ-VILLALOBOS N.; GARRICK D. J.; SHALLOO, L. Development and application of a processing model for the Irish dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5091-5100, 2010.

GLANTZ, M.; DEVOLD, T. G.; VEGARUD, G. E.; MÅNSSON, H. L.; STÅLHAMMAR, H.; PAULSSON, D. M. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1444-1451, 2010.

GODDARD, M. Genetics to improve milk quality. Australian Journal of Dairy Technology. Sidney, v.56, n.2, p.166-170, 2001.

GRAML, R.; PIRCHNER, F. Effects of milk protein loci on content of their proteins. **Archiv für Tierzucht**, v. 46, n. 4, p. 331-340, 2003.

GRIGOL, N. S. CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Boletim do leite. ESALQ/USP, Ano 20 nº 226, Fevereiro, 2014.

GUETOUCHE, M.; GUESSAS, B.; MEDJEKAL, S. Review - Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v.2, n.10, p.115-122, 2014.

GUNASEKARAN, S.; AK, M. M. **Cheese Rheology and Texture**. CRC Press, 2002.

GUSTAVSSON, F.; BUITENHUIS, A. J.; GLANTZ, M.; STÅLHAMMAR, H.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; POULSEN, N.A.; LARSEN, L.B.; ANDRÉN, A.; PAULSSON, M. Impact of genetic variants of milk proteins on chymosin-induced gelation properties of milk from individual cows of Swedish Red dairy cattle. **International Dairy Journal**, v. 39, 102-107, 2014.

HALLÉN, E.; ALLMERE, T.; NÄSLUND, J.; ANDRÉN, A.; LUNDÉN, A. Effect of genetic polymorphism of milk proteins on rheology of chymosin-induced milk gels. **International Dairy Journal**, v.17, p.791-799, 2007.

HALLÉN E.; WEDHOLM A.; ANDRÉN A.; LUNDÉN A. Effect of beta-casein, kappa-casein and beta-lactoglobulin genotypes on concentration of milk protein variants. **Journal Animal Breed Genetic**. 125, 119-129, 2008.

HALLÉN, E.; LUNDÉN, A.; TYRISEVÄ, M. W.; ANDRÉN, A. Composition of poorly and non-coagulating bovine milk and effect of calcium addition. **Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 398-403, 2010.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B.; SEYKORA, A. J.; JOHNSON, D. G.; LINN, J. G.; ROMANO, J. E.; HAZEL, A. R. Crossbreds of Jersey x Holstein compared with pure Holsteins for production, fertility, and body and udder measurements during first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.1270-8, 2008.

HILL, J. P. The relationship between beta-lactoglobulin phenotypes and milk composition in New Zealand dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 1, p. 281-286, 1993.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in protein chemistry**, v. 43, p. 63-151, 1992.

HORNE, D. S. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 171-177, 1998.

HORNE, D. S. Casein micelles as hard spheres: Limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, p. 255-263, 2003.

HORNE, D. S.; BANKS, J. M. Rennet-induced coagulation of milk. In: FOX, P. F; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P (Ed.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. London: Elsevier Academic Press, 2004. p. 47-70.

HUSSAIN, I.; BELL, A. E.; GRANDISON, A. S. Comparison of the rheology of mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. **Food Chemistry**, v.128, 500-504, 2011.

HUSSAIN, I.; GRANDISON, A. S.; BELL, A. E. Effects of gelation temperature on Mozzarella-type curd made from buffalo and cows' milk. 1: Rheology and microstructure. **Food Chemistry**, v. 134, p.1500-1508, 2012.

HYSLOP, D. B. in: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins, Kluwer Academic/Plenum, New York, 2003, p. 839.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 43, p.1-49, 2015.

IDF. International IDF Standard 141C:2000. Determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation, Brussels, Belgium; 2000.

IDF International Dairy Federation 148-2E. Milk-Enumeration of somatic cells. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. International Dairy Federation, Brussels, Belgium; 2006.

IKONEN, T.; AHLFORS, K.; KEMPE, R.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of noncoagulating milk in Finnish dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 205-214, 1999.

IKONEN, T.; MORRI, S.; TYRISEVÄ, A. M.; RUOTTINEN, O.; OJALA, M. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits,

Somatic Cell Count, Casein Content and pH of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 458-467, 2004.

JENSEN, R. G. Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 295-350, 2002.

JENSEN, H. B.; HOLLAND, J. W.; POULSEN, N. A.; LARSEN, L. B. Milk protein variants and isoforms identified in bovine milk representing extremes in coagulation properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95, 2891-2903, 2012.

JÕUDU, I.; HENNO, M.; KAART, T.; PÜSSA, T.; KÄRT, O. The effect of milk proteins contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 964-967, 2008.

JÕUDU, I.; HENNO, M.; VÄRV, S.; VIINALASS, H.; PÜSSA, T.; KAART, T.; ARNEY, D.; KÄRT, O. The effect of milk proteins on milk coagulation properties in Estonian dairy breeds. **Veterinarija ir Zootechnika** v. 46, p. 14-19, 2009.

KARLSSON, A. O.; IPSEN, R.; ARDÖ, Y. Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1053-1062, 2007a.

KARLSSON, A. O.; IPSEN, R.; ARDO, Y. Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p.674-682, 2007b.

KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological characterization of polymer gels. **Progress in Polymers Science**, v. 23, p. 533-562, 1998.

KÜBARSEPP, I.; HENNO, M.; VIINALASS, H.; SABRE, D. Effect of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genotypes on the milk rennet coagulation properties. **Agronomic Research**, v.3, p.55-64, 2005.

LAXTON, P. B.; BERG, J. C. Gel trapping of dense colloids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, 152-157, 2005.

LAW, B. A.; TAMIME, A. Y. Technology of Cheesemaking. United Kingdom: Society of Dairy Technology, 2010.

LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 1-13, 2011.

LODES, A.; KRAUSE, I.; BUCHBERGER, J.; AUMANN, J.; KLOSTERMEYER, H. The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. II. Rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 543-548, 1996.

LODES, A.; BUCHBERGER, J.; KRAUSE, I.; AUMANN, J.; KLOSTERMEYER, H. The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological



properties of milk. Content os protein, casein, whey protein and casein number. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 1, 3-8, 1997.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529-542, 1998.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; HARJINDER SINGH, H.; MUNRO, P. A. Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p.555-567, 1998.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; PETER A. MUNRO, P. A. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- $\delta$ -lactone. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 415-427, 2000.

LUCEY, J. A. ADSA-Foundation Scholar Award Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.281-294, 2002.

LUCEY, J. A. Rennet-Induced Coagulation of Milk. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 579-584, 2011.

MALACARNE, M.; FIENI, S.; TOSI, F.; FRANCESCHI, P.; FORMAGGIONI, P.; SUMMER, A. Seasonal variations of the rennet-coagulation properties of herd milks in Parmigiano-Reggiano cheese manufacture: comparison between Italian Friesian and Italian Brown cattle breeds. **Italian Journal Animal Science**, v.4, n. 2, p. 242-244, 2005.

MARIANI, P.; PECORARI, M. Il ruolo delle varianti genetiche della  $\kappa$ -caseina nella produzione del formaggio. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 42, p. 255-285, 1991.

MARIANI, P.; SUMMER, A.; FORMAGGIONI, P.; MALACARNE, M. La qualità casearia del latte di differenti razze bovine. **La Razza Bruna Italiana**, n.1, 7-13, 2002.

MATIOLI, G. P.; PINTO, S. M.; ABREU, L. R.; XAVIER, L.; TEIXEIRA, L. A. M. Effect of milk from cows with mastitis on the production of fresh Minas cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, p. 38-45, 2000.

MAZAL, G.; VIANNA, P. C. B.; SANTOS, M. V.; GIGANTE, M. L. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.630-636, 2007.

MCMAHON, D. J.; BROWN, R. J. Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p.1639-642, 1982.

MELLEMA, M.; LEERMAKERS, F. A. M.; DE KRUIF, C. G. Molecular mechanism of the renneting process of casein micelles in skim milk, examined by viscosity and light-scattering experiments and simulated by model SCF calculations. **Langmuir**, v.15, p.6304-6313, 1999.

MIRANDA, J. E. C; FREITAS, A. F. **Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite**. Embrapa-Circular Técnica, v. 98, 12p. 2009.

MISHRA, R.; GOVINDASAMY-LUCEY, S.; LUCEY, J. A. Rheological properties of rennet induced gels during the coagulation and cutting process: Impact of processing conditions. **Journal of Texture Studies**, 36, 190-212, 2005.

MOLLÉ, D.; LÉONIL, J. Heterogeneity of the bovine K-casein caseinomacropeptide, resolved by liquid chromatography on-line with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1995; v.708, n. 2, p. 223-30, 1995.

MOLINA, L. H.; KRAMM, J.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PINTO, M.; FERRANDO, A. Protein composition of milk from Holstein-Friesian dairy cows and its relationship with the genetic variants A and B of kappa-casein and beta-lactoglobulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 183-187, 2006.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSSEHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143-148, 1999.

NRC. National Research Council. Committee on Animal Nutrition Agricultural Board. "Atlas of Nutritional Data on United and Canadian Feed." National. Academy. Science. Washington. D.C, 1971.

O'CALLAGHAN, D. J.; MULHOLLAND, E. P.; DUFFY, A. P.; O'DONNELL, C. P.; PAYNE, F. A. Evaluation of hot wire and optical sensors for online monitoring of curd firmness during milk coagulation. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 40, n. 227-238, 2001

O'CALLAGHAN, D. J.; O'DONNELL, C. P.; PAYNE, F. A. Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 65-74, 2002.

OECD-FAO. (2013). OECD-FAO agricultural Disponivel em <<http://www.oecd.org/site/oecdfoagriculturaloutlook/>>. Acesso em: 23 abril 14.

OKIGBO, L. M.; RICHARDSON, G. H.; BROWN, R. J.; ERNSTROM, C. A. Variation in coagulation properties of milk from individual cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 822-828, 1985.

OLENSKI, K.; KAMINSKI, S.; SZYDA, J.; CIESLINSKA, A. Polymorphism of beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls. **Livestock Science**, v. 131 p. 137-140, 2010.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos**. Alimentos de Origen Animal. Porto Alegre: Artimed, 2005.

PATERSON, G. R.; MAGGIBON, A. K. H.; HILL, J. P. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin phenotype on the heat stability of milk. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3, p. 375-376, 1999.

PENASA, M.; CASSANDRO, M.; PRETTO, D.; DE MARCHI, M.; COMIN, A.; CHESSA, S.; DAL ZOTTO, R.; BITTANTE, G. Short communication: Influence of composite casein

genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 3346-3349, 2010.

PENASA, M.; TIEZZI, F.; STURARO, A.; CASSANDRO, M.; DE MARCHI M. A comparison of the predicted coagulation characteristics and composition of milk from multi-breed herds of Holstein-Friesian, Brown Swiss and Simmental cows. **International Dairy Journal**, v. 35, p. 6-10, 2014.

PENASA, M.; DE MARCHI, M.; TON, S.; ANCILOTTO, L.; CASSANDRO, M. Reproducibility and repeatability of milk coagulation properties predicted by mid-infrared spectroscopy. **International Dairy Journal**, v. 47, p.1-5, 2015.

PENASA, M.; TOFFANIN, V.; COLOGNA, N.;CASSANDRO, M.; DE MARCHI, M. Effects of dairy factory, milk casein content and titratable acidity on coagulation properties in Trentingrana dairy industry. **Journal of Dairy Research** v. 83, p.242-248, 2016.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. **Journal of Dairy Science**, v.71, p. 1711 - 1719, 1988.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K.F. Effects of somatic cell counts and milk composition on the coagulating properties of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1740-1746, 1988.

POULSEN, N. A., GREGERSEN, V. R., MACIEL, G. M., MADSEN, L. B., BUITENHUIS, B., HANSEN, M. S., BENDIXEN, C., LARSEN, L. B. Novel genetic variation associated to CSN3 strongly affects rennet-induced milk coagulation, *International Dairy Journal*, v. 71, p.122-130, 2017.

PRENDIVILLE, R.; PIERCE, K. M.; BUCKLEY, F. An evaluation of production efficiencies among lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian cows at pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.6176-85, 2009.

PRENDIVILLE, R.; PIERCE, K.M.; BUCKLEY, F. A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 cross with regard to milk yield, somatic cell score, mastitis, and milking characteristics under grazing conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p.2741-2750, 2010.

PRETTO, D.; KAART, T.; VALLAS, M.; JÕUDU, I.; HENNO, M.; ANCILOTTO, L.; CASSANDRO, M.; PÄRNA, E. Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 4336-4346, 2011.

PRETTO, D.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; PENASA, M.; CASSANDRO, M. Genetic response for milk production traits, somatic cell score, acidity and coagulation properties in Italian Holstein–Friesian population under current and alternative selection indices and breeding objectives. **Livestock Science**, v. 150, p. 59-66, 2012.

- PRETTO, D.; DE MARCHI, M.; PENASA, M.; CASSANDRO, M. Effect of milk composition and coagulation traits on Grana Padano cheese yield under field conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1-5, 2013.
- RIBAS, N. P. Laboratório processa 300 mil amostras de leite. **Revista Gado Holandês**. n.489, p.11, 2000.
- RODRIGUEZ, L.W.; MEKONNEN, G.; WILCOX, C.J.; MARTIN, F.G.; KRIENK, W.A. Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy and stage of lactation on milk composition and yield. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.973-978, 1985.
- ROSELER, D. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C. J. HERREMA, J. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 525-534, 1993.
- RUETTIMANN K. W.; LADISCH, M. R. Review: Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 9, p. 578-589, 1987.
- SANDRA, S.; HO, M.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.75-82, 2012.
- SCHNEIDER P. L.; BEEDE D. K.; WILCOX C. J. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 112-125, 1998.
- SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. Germany: Karlsruhe, 2000.
- SHARMA, N. Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows - A review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 2, n. 2, 50-62, 2007.
- SENGE, B.; SCHULZ, D.; KRENKEL, K. Structure formation in milk during rennet coagulation. **Applied Rheology**, v.7, n. 4, p.153-160, 1997.
- SRINIVASAN, M.; LUCEY, J. A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1070-1078, 2002.
- STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. USA: East Lansing, 1996.
- STELZER, F. S.; LANA, R. P.; CAMPOS, J. M. S.; MANCIO, A. B.; PEREIRA, J. C.; LIMA, J. G. Desempenho de vacas leiteiras recebendo concentrado em diferentes níveis, associado ou não a própolis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1381-1389, 2009.
- SUMMER, A.; MALACARNE, M.; MARTUZZI, F.; MARIANI, P. Structural and functional characteristics of Modenese cow milk in Parmigiano-Reggiano cheese production. **Annali...Facoltà di Medicina Veterinari di Parma**. v. 22, p. 163-174, 2002.

TIEZZI, F.; PRETTO, D.; DE MARCHI, M.; PENASA, M.; CASSANDRO, M. Heritability and repeatability of milk coagulation properties predicted by mid-infrared spectroscopy during routine data recording, and their relationships with milk yield and quality traits. **Animal**, v. 7, n. 10, p. 1592-1599, 2013.

TIEZZI, F.; VALENTE, D. B.; CASSANDRO, M.; MALTECCA, C. Causal relationships between milk quality and coagulation properties in Italian Holstein-Friesian dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, p. 47:45, 2015.

TOFFANIN, V.; DE MARCHI, M.; PENASA, M.; PRETTO, D.; CASSANDRO, M. Characterization of milk coagulation ability in bulk milk samples. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 3, p. 93-98, 2012.

TOFFANIN, V.; DE MARCHI, M.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; CASSANDRO, M. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy for prediction of the contents of calcium and phosphorus, and titratable acidity of milk and their relationship with milk quality and coagulation properties. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 68-73, 2015.

TYRISEVÄ, A. M.; VAHLSTEN, T.; RUOTTINEN, O.; OJALA, M. Noncoagulation of milk in Finnish Ayrshire and Holstein-Friesian cows and effect of herds on milk coagulation ability. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3958-3966, 2004.

VALLAS, M.; BOVENHUIS, H.; KAART, T.; PÄRNA, K.; KIIMAN, H.; PÄRNA, E. Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3789-3796, 2010.

VAN EENENNAAM, A. L.; MEDRANO, J. F. Differences in allelic protein expression in the milk of heterozygous  $\kappa$ -casein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1491-1496, 1991.

VERCESI FILHO, A. E. Identificação de alelos para o gene da beta-caseína na raça gir leiteiro. **APTA Regional Nordeste Paulista, Pesquisa & Tecnologia**, vol. 8, n. 108, 2011.

VIANNA, P. C. B.; MAZAL, G.; SANTOS, M. V.; BOLINI, H. M. A.; GIGANTE, M. L. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1743-1750, 2008.

WALSTRA, P.; VAN VLIET, T. The physical chemistry of curd making. **Milk Dairy Journal**, v. 40, p. 241-259, 1986.

WALSTRA, P. The syneresis of curd. Pages 141-191 in **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, v.1. General Aspects. 2 ed. P. F. Fox. London: Chapman and Hall, 1993.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, p. 189-192, 1999.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. New York: CRC, p.166-167, 2006.

WEDHOLM, A.; LARSEN, L. B; LINDMARK-MANSSON, H.; KARLSSON, A. H.; ANDREN, A. Effect of protein composition on the cheesemaking properties of milk from individual dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 89, p. 3296-3305, 2006.

WEST, J. W.; MULLINIX B. G.; BERNARD J. K. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 232-242, 2003.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M.W.; ANEMA, S. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 393-402, 2002.

YOUSIF, B. H.; McMAHON, D. J.; SHAMMET, K. M. Milk clotting enzymes from *Solanum dobiuimplant*. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 6, p. 637-644, 1996.

ZANNONI, M.; ANNIBALDI, S. Standardization of the renneting ability of milk by Formagraph. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 32, p. 79-94, 1981.

ZIMBELMAN, R. B; COLLIER, R. J.; BILBY, T. R. Effects of utilizing rumen protected niacin on core body temperature as well as milk production and composition in lactating dairy cows during heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.180, p. 26-33, 2013.

ZOOCAL, R. Dez países top no leite. (Juiz de Fora, 2017). Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/dez-paises-top-no-leite/>. Acesso em: 10 maio 17.

ZOON, P.; VAN VLIET, T.; WALSTRA, P. Rheological properties of rennet-induced skim milk gels. 1. Introduction. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 42, p. 249-269, 1988.